



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Caracterização da Resposta Imune Humoral de Indivíduos com  
Doença de Chagas**

**Iolanda Cristina Banha Alves**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE  
TROPICAL, ESPECIALIDADE EM SAÚDE TROPICAL**

JANEIRO 2017





**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Caracterização da Resposta Imune Humoral de Indivíduos com  
Doença de Chagas**

**Mestranda:** Iolanda Cristina Banha Alves

**Orientador:** Prof. Doutor Marcelo Sousa Silva

Dissertação apresentada para o cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Saúde Tropical, especialidade em Saúde Tropical, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor Marcelo Sousa Silva.

JANEIRO 2017



*À minha família, pelo apoio incondicional.*

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Marcelo Sousa Silva pela oportunidade de desenvolver este estudo, orientação, energia positiva, calma em todos os momentos e pela confiança depositada.

Obrigada em especial à Professora Doutora Rosa Teodósio pela amizade, conselhos e disponibilidade em todos os momentos.

À Professora Gabriela Santos-Gomes por todo o apoio, disponibilidade e simpatia.

Ao Professor Jorge Seixas pelo interesse neste trabalho, disponibilidade e sugestões.

Ao Investigador João Tavanez, por todas as lições, oferta de material e reagentes, disponibilidade, otimismo e paciência infinita.

Às minhas colegas de laboratório Yorleydi Ruiz Moreno e Silvia Donato pela boa disposição, pela música latina e forró brasileiro, pelos almoços, pelo otimismo, apoio na execução de tarefas, disponibilidade e paciência. Tornaram todo o trabalho mais fácil.

Ao meu colega Jailson Querido, que apesar de longe esteve sempre disponível para me ajudar e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aos meus amigos, em especial à Inês Santos e à Sara Carmona pela amizade, otimismo e por acreditarem em mim.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais e aos meus irmãos pelo apoio, amor e carinho em todos os momentos e à tia Zibelinha por todo apoio e força.

## Resumo

Inicialmente confinada à América Latina a doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomose Americana, é atualmente um problema de saúde pública que afeta 8 milhões de pessoas em todo o mundo. A terapêutica existente só tem eficácia adequada quando instituída na fase aguda o que, associado à dificuldade do diagnóstico neste período, contribui para grande parte da morbidade e mortalidade associada à doença. Na fase crônica da infecção, a parasitemia diminui para níveis quase indetectáveis tornando difícil a observação do parasita no sangue. Neste período o diagnóstico da doença é centrado em métodos serológicos que detetam sobretudo anticorpos do tipo IgG anti-*T. cruzi*, dos quais a técnica de eleição é o ELISA. *T. cruzi*, o agente etiológico da doença tem mais de 6000 estirpes, organizadas em seis linhagens genéticas e durante o seu ciclo de vida assume três formas com perfis antigénicos distintos, o que dificulta a utilização de um único teste no diagnóstico da doença de Chagas. Atualmente a confirmação do diagnóstico requer dois testes serológicos diferentes positivos e com preparações de antígenos distintas.

Este estudo tem como objetivo caracterizar a reatividade serológica dos antígenos de *T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y utilizando soros de indivíduos com doença de Chagas. Os resultados obtidos podem contribuir para encontrar marcadores serológicos que possam ser usados no desenvolvimento de um teste de diagnóstico único de elevada sensibilidade e especificidade e uma melhor compreensão da resposta imune humoral desenvolvida durante a doença de Chagas.

Tendo em conta o objetivo proposto foram determinados os níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* por *in-house* ELISA de 330 soros de indivíduos com doença de Chagas provenientes de vários países da América Latina imigrantes na Europa e de forma a identificar as proteínas do parasita responsáveis pela reatividade sorológica dos soros, foi feita a análise dos mais reativos por Immunoblotting.

Dos 330 soros analisados por ELISA, 278 foram positivos para IgG total e 116 para IgM. Na imunodeteção de proteínas do parasita por Immunoblotting, foi possível distinguir proteínas com o tamanho aproximado de 25-37, 37-50, 50, 50-75, 75, 100, 150 e 150-250 kDa.

Palavras chave: Doença de Chagas, *T. cruzi*, resposta imune humoral, anticorpos anti-*T. cruzi*, antígenos *T. cruzi*

## ***Abstract***

Initially confined to Latin America, Chagas disease, also known as American Trypanosomiasis, is currently a public health problem that affects 8 million people worldwide. Existing therapy only has adequate efficacy when instituted in the acute phase, which, combined with the difficulty of diagnosis during this period, contributes to a large part of the morbidity and mortality associated with the disease. In the chronic phase of infection, the parasitemia decreases to almost undetectable levels, making it difficult to observe the parasite in the blood. At this time, the disease diagnosis is centered on serological methods that mainly detect *anti-T. cruzi* IgG antibodies, of which ELISA is the technique of choice. *T. cruzi*, the etiological agent of the disease, has more than 6000 strains, organized into six genetic lines and during its life cycle assumes three forms with distinct antigenic profiles, which makes it difficult to use a single test in the diagnosis of Chagas disease. At present, diagnosis confirmation requires two different serological tests positive and with preparations of different antigens.

This study aims to characterize the serological reactivity of *T. cruzi* antigens of the trypomastigote form of strain Y using sera of individuals with Chagas' disease. The results obtained can contribute to find serological markers that can be used in the development of a single test of high sensitivity and specificity and a better understanding of the humoral immune response developed during Chagas' disease.

To this purpose, the levels of anti-*T. cruzi* antibodies in 330 sera of individuals with Chagas' disease from several Latin American countries, emigrants in Europe were determined by ELISA and in order to identify the proteins of the parasite responsible for sera serological reactivity, the most reactive were analyzed by Immunoblotting.

Of the 330 sera analyzed by ELISA, 278 were positive for total IgG and 116 for IgM. By immunodetection of parasite proteins by Immunoblotting it was possible to distinguish proteins with the approximate size of 25-37, 37-50, 50, 50-75, 75, 100, 150 e 150-250 kDa.

**Keywords:** Chagas disease, *T. cruzi*, humoral immune response, anti-*T. cruzi* antibodies, *T. cruzi* antigens



# Índice

Índice de figuras	viii
Índice de quadros	ix
Lista de abreviaturas	x
<b>1. Introdução</b>	<b>2</b>
<b>2. Revisão da Literatura</b>	<b>6</b>
2.1. Epidemiologia da doença de Chagas	6
2.2. O vetor da doença de Chagas	8
2.3. Medidas de controlo e eliminação da doença de Chagas	9
2.4. O agente etiológico da doença de Chagas	10
2.5. Formas de transmissão da doença de Chagas	13
2.6. Manifestações clínicas da doença de Chagas	14
2.7. Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas	17
2.7.1. Diferentes métodos de diagnóstico	17
2.7.2. Métodos de diagnóstico e antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2.8. Imunologia da doença de Chagas	21
2.8.1. Resposta imune a <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
2.8.2. Resposta imune humoral – Produção de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i>	22
<b>3. Objetivos do estudo</b>	<b>24</b>
3.1. Questão de investigação	24
3.2. Objetivo Geral	24
3.3. Objetivos específicos	24
<b>4. Material e métodos</b>	<b>27</b>
4.1. Cultura de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
4.2. Extração e quantificação das proteínas totais	27
4.3. População em estudo e dimensão da amostra	28
4.4. Considerações éticas	28
4.5. Determinação de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> por <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	29

4.6. Imunodeteção de antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i> por <i>Immunoblotting</i>	30
<b>5. Resultados e discussão</b>	<b>34</b>
<b>6. Conclusões</b>	<b>53</b>
<b>7. Limitações e perspectivas futuras</b>	<b>56</b>
<b>8. Bibliografia</b>	<b>59</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>69</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Estimativas oficiais da distribuição global da doença de Chagas de 2006 a 2010.	7
<b>Figura 2</b> - Fotografias de espécies de triatomíneos <i>Triatoma</i> e <i>Paratriatoma</i> .	8
<b>Figura 3</b> - Ilustração das formas morfológicas que <i>T. cruzi</i> assume durante o seu ciclo de vida.	11
<b>Figura 4</b> - Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	13
<b>Figura 5</b> - Evolução Clínica da doença de Chagas e métodos de diagnóstico disponíveis em cada fase.	16
<b>Figura 6</b> - Reatividade serológica dos anticorpos do tipo IgG total e IgM presentes em amostras de 330 soros de indivíduos da América Latina imigrantes na Europa.	35
<b>Figura 7</b> - Reatividade serológica dos anticorpos do tipo IgG total presentes em amostras de 330 soros de indivíduos da América Latina imigrantes na Europa.	36
<b>Figura 8</b> - Reatividade serológica dos anticorpos IgM presentes nas amostras de soros de indivíduos da América Latina imigrantes na Europa.	39
<b>Figura 9</b> - Perfil eletroforético do extrato total de <i>T. cruzi</i> tripomastigota da estirpe Y em gel de poliacrilamida.	45
<b>Figura 10</b> - Perfil do Immunoblotting utilizando extrato total de <i>T. cruzi</i> tripomastigota da estirpe Y.	46

## Índice de quadros

<b>Quadro 1</b> - Preparação do gel de separação e gel de concentração para a separação de proteínas de <i>T. cruzi</i> de acordo com a sua massa molecular.	31
<b>Quadro 2</b> - Distribuição dos países da população em estudo de acordo com o seu número de soros com reatividade serológica positiva e negativa para anticorpos do tipo IgG total anti- <i>T. cruzi</i> .	38
<b>Quadro 3</b> - Distribuição dos países da população em estudo de acordo com o seu número de soros com reatividade serológica positiva e negativa para anticorpos do tipo IgM anti- <i>T. cruzi</i> .	40
<b>Quadro 4</b> - Peso molecular das proteínas de <i>T. cruzi</i> tripomastigota da estirpe Y que reagiram com anticorpos do tipo IgG total presentes	49
<b>Quadro 5</b> - Proteínas de <i>T. cruzi</i> tripomastigota descritas na literatura, de acordo com a sua massa molecular.	51

## Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico	IPA – <i>Andean Country Initiative</i>
AMCHA – <i>Amazon Country Initiative</i>	LIT - <i>Liver Infusion Tryptose</i>
APS – Persulfato de amónio	NK – <i>Natural killer</i>
ARN – Ácido ribonucleico	NO – Óxido nítrico
BSA – <i>Bovine serum albumin</i>	OMS – Organização Mundial de Saúde
CRA – Antígeno repetido citoplasmático	OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
DC – Doença de Chagas	PBS – <i>Phosphate buffered saline</i>
DTN – Doença Tropical Negligenciada	pNPP - 4-nitrofenil fosfato
DTUs – <i>Discrete Typing Units</i>	SAPA - Antígeno de fase aguda libertado
ELISA – <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	TA – Tripanossomose Americana
FRA – Antígeno repetido flagelar	<i>Trypanosoma cruzi</i> – <i>T. cruzi</i>
GPI – Glicofosfatidilinositol	TESA – Antígeno excretado-secretado de tripomastigota
IFN – Interferão	TNF – Fator de necrose tumoral
Ig – Imunoglobulina	TSSA - Antígeno de superfície pequeno de tripomastigota
IFI – Imunofluorescência indireta	
HI – Hemaglutinação indireta	
IL – Interleucina	
INCOSUR – <i>Southern Cone Initiative</i>	

## 1. Introdução

### 1. Introdução

Inicialmente confinada à América Latina a doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomose Americana, é atualmente considerada um problema de saúde pública que afeta cerca de 8 milhões de pessoas em todo o mundo, incluindo na América do Norte, Japão, Europa e Austrália e com um custo anual estimado em mais de 7 (4-11) mil milhões de dólares, incluindo a perda de produtividade. Devido à sua importância em termos de mortalidade e morbidade é considerada pela OMS uma das principais doenças tropicais negligenciadas (Nunes et al, 2013; WHO Report, 2015).

O homem infeta-se pela inoculação da forma infetante do parasita (tripomastigota metaciclíco) presente nas fezes do vetor, um inseto hematófago da subfamília triatominae (Reduviidae) conhecido vulgarmente por triatomíneo. A infeção ocorre maioritariamente quando o inseto após a sua refeição de sangue defeca junto ao local da picada, geralmente a face; quando o homem coça a zona irritada este penetra na lesão cutânea, mucosa oral ou conjuntiva. O triatomíneo é comum encontrar-se nas fendas das paredes das casas de barro, típicas das zonas rurais e periurbanas da América Latina (CDC, 2015; WHO Epid., 2015).

A principal forma de transmissão das Tripanossomose Americana é pelo inseto vetor, uma forma de transmissão que ocorre exclusivamente no Continente Americano (Bern, 2015). Em zonas onde existe transmissão intra-domiciliária o triatomíneo pica sobretudo crianças com menos de 5 anos e nas zonas onde não existe são infectas maioritariamente crianças mais velhas que praticam atividades ao ar livre (WHO Epid., 2015; WHO Report, 2015). A doença de Chagas também pode ser transmitida por transfusões de sangue, transplantes de órgãos, de mãe para filho, em acidentes laboratoriais e pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas, uma forma de transmissão que tem ganho importância nos últimos anos com a ocorrência de microepidemias na região da Amazônia associadas ao consumo de açaí, fruto da palmeira e sumos de açúcar de cana.

Tendo em conta a sua evolução clínica, a doença de Chagas é considerada uma doença bifásica, com uma fase aguda, que ocorre 8 a 10 dias após a infeção e pode durar 4 a 8 semanas, e uma fase crónica. A fase aguda raramente é observada uma vez que apenas

5% dos indivíduos são sintomáticos e a maioria dos sintomas são inespecíficos. 70 a 80% dos doentes que evoluem para a fase crónica permanecem numa forma clínica indeterminada assintomática, uma fase crónica protetora. Os restantes evoluem para a forma clínica sintomática, uma fase crónica patogénica que pode ter início 10 a 30 anos após a fase inicial. Pensa-se que a estirpe do parasita, a carga parasitária, a resposta imune e a presença ou ausência de reinfeção são fatores que podem determinar a evolução para uma fase crónica protetora ou patogénica bem como o tipo de manifestação crónica: miocardiopatia crónica chagásica ou megaesófago ou megacólon chagásicos (Andrade et al, 2014; Mandal, 2014;).

Na fase aguda, *T. cruzi* encontra-se na circulação sanguínea e pode ser demonstrado diretamente a fresco, em gota espessa ou esfregaço corado. Com a progressão da infeção o parasita assume o seu habitat preferencial intracelular em miócitos e neurónios. Nesta fase é, portanto, muito difícil de observar no sangue periférico (Andrade et al, 2014; Mandal, 2014;).

Na fase crónica da infeção o diagnóstico é centrado em métodos serológicos que detetam anticorpos do tipo IgG anti-*T. cruzi* dos quais o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) é o teste de diagnóstico de eleição (Messenger et al, 2015; Santos et al, 2012). A confirmação do diagnóstico requer atualmente dois ensaios serológicos distintos. A variabilidade genética de *T. cruzi* dificulta a utilização de um teste único e de bom desempenho (WHO Report, 2015).

Atualmente existem dois fármacos antiparasitários disponíveis para tratar a infeção, o Benznidazole, o medicamento de primeira linha na maioria dos países, e o Nifurtimox. Ambos apresentam eficácia adequada quando administrados na fase aguda da doença, na forma congénita e nas reativações por imunossupressão, o que associado à dificuldade do diagnóstico neste período, contribui para grande parte da morbilidade e mortalidade associadas à doença (Arce-Fonseca et al, 2015; WHO Report, 2015).

Recentemente tem havido um interesse crescente no estudo das moléculas presentes na superfície do parasita devido à sua capacidade de induzirem a produção de várias classes de anticorpos no homem durante a infeção (Cardoso et al, 2016) e o potencial de serem a



chave para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico único, com elevada sensibilidade e especificidade (Arce-Fonseca et al, 2015; WHO Report, 2015).

## **2. Revisão da literatura**

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Epidemiologia da doença de Chagas

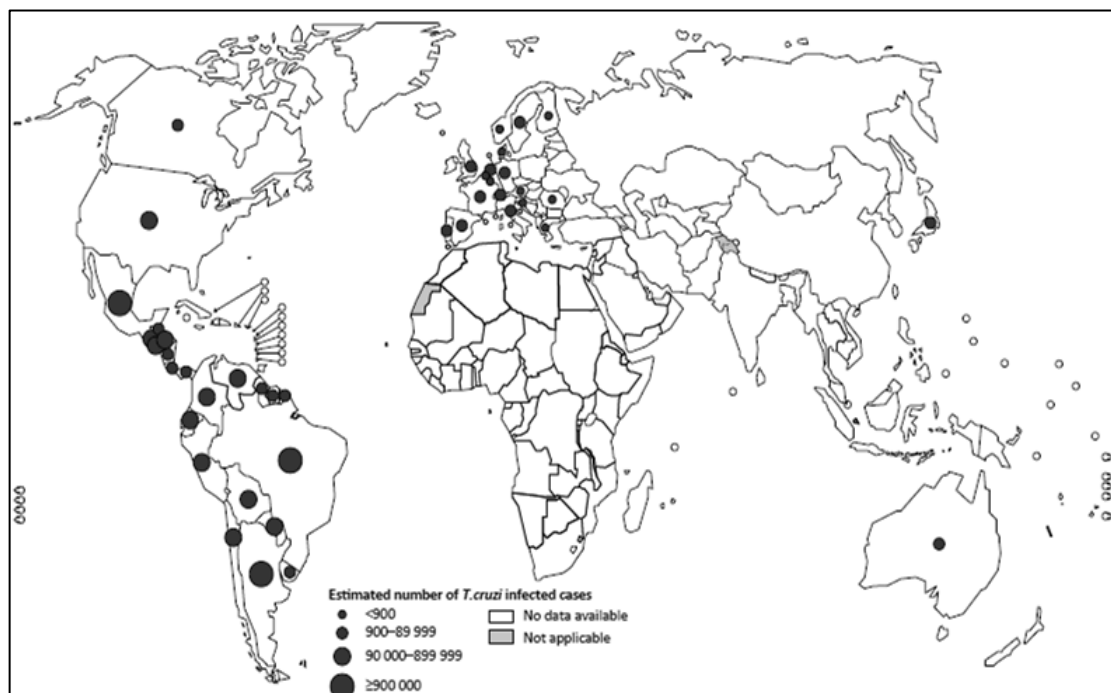
Há 26-12 mil anos atrás quando o homem chegou ao continente americano contactou pela primeira vez com a doença de Chagas, que já existia no atual território dos EUA até à Argentina e Chile há 10 milhões de anos (Araújo et al, 2009; Ferreira et al, 2011). A Doença de Chagas também conhecida como Tripanossomose Americana permaneceu restrita ao Continente Americano até aos séculos XVI-XIX, período em que a colonização, a agricultura, pecuária, deflorestação, desenvolvimento das rotas marítimas e ferroviárias alavancaram a sua disseminação dentro e fora do continente (WHO Epid., 2015). Começaram a ser descritos casos de indivíduos com sintomas semelhantes aos da Tripanossomose Americana no século XVI (Steverding, 2014) mas só em 1908, no Brasil, o médico sanitaria Carlos Chagas descobre um parasita do género *Trypanosoma* ao qual viria a chamar *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em homenagem ao seu amigo e mentor Oswaldo Cruz. Nos anos seguintes descreve o ciclo de vida, modo de transmissão e manifestações clínicas da doença (Kropf & Sá, 2009).

Nos anos 80 a doença já era endémica em 18 países, afetava cerca de 17 milhões de pessoas e colocava em risco 100 milhões. Dez anos depois, a implementação de iniciativas de controlo levou a uma redução importante da doença em vários países da América Latina (WHO Epid., 2015). Em simultâneo, o início do tráfego aéreo, o crescente número e a rapidez dos movimentos populacionais levaram a uma mudança do perfil epidemiológico da doença. Os casos de doença de Chagas, que anteriormente ocorriam maioritariamente em áreas endémicas, rurais e periurbanas, associados à transmissão vetorial, começaram recentemente a emergir em áreas não endémicas, urbanas, associados a transfusões de sangue, transplantes de órgãos e transmissão de mãe para filho (Messenger et al, 2015; Nunes et al, 2013; WHO Report, 2015).

A doença de Chagas é agora uma doença global, afeta cerca de 8 milhões de pessoas em todo o mundo incluindo na América do Norte, Japão, Europa e Austrália, ainda que 80% destas estejam concentradas em 21 países da América Latina (WHO Report, 2015). Esta

tem um fardo económico global que em 2013 se estimou em mais de 7 (4-11) mil milhões de dólares americanos por ano, incluindo a perda de produtividade associada a dias de doença (DALYS) (Lee et al, 2013; Nunes et al, 2013).

Tendo em conta a sua distribuição geográfica particular, o fato de afetar sobretudo indivíduos mais carenciados, a sua importância em termos de mortalidade e morbilidade, impacto socioeconómico significativo e prioridade política, a Tripanossomose Americana é considerada pela OMS uma das principais doenças tropicais negligenciadas (Nunes et al, 2013; WHO Epid., 2015). Segundo a organização, esta enfermidade deverá ser eliminada do Continente Americano até 2020. Ainda que com um progresso sem precedentes na sua redução, esta continua a representar um impedimento significativo ao cumprimento dos objetivos de desenvolvimento do milénio (WHO Report, 2015).

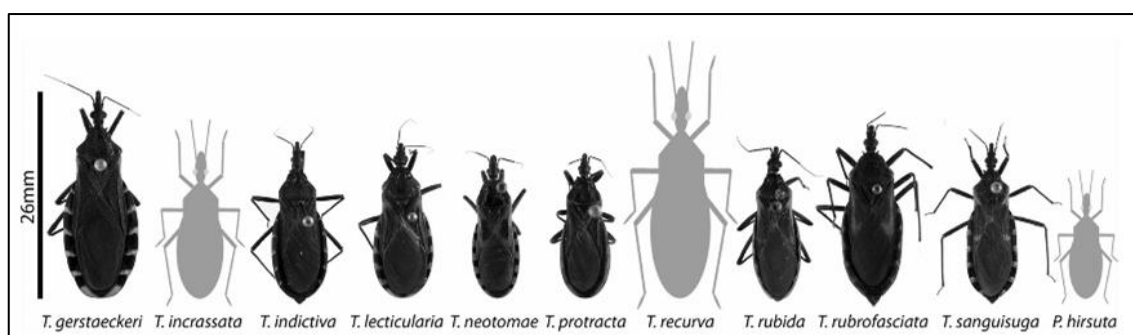


**Figura 1** - Estimativas oficiais da distribuição global da doença de Chagas de 2006 a 2010. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/en/>.

### 2.2. O vetor da doença de Chagas

O vetor da doença de Chagas é o triatomíneo, um inseto hematófago da família Reduviidae e subfamília Triatominae (WHO Epid., 2015). Existem 15 géneros de triatomíneos que transmitem o parasita para o homem, mas as espécies *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* são as mais importantes. Do ponto de vista epidemiológico o *Panstrongylus megistus* é uma espécie relevante (Mandal, 2014; WHO Epid., 2015).

O *Triatoma infestans* é o principal vetor da doença de Chagas e o principal alvo das iniciativas de controlo dos países do Cone Sul – Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai (Moncayo & Silveira, 2009; WHO Epid., 2015). Na América central e no noroeste da América do Sul, o triatomíneo da espécie *Rhodnius prolixus* é o principal vetor da Tripanossomose Americana com populações domiciliárias conhecidas. No Brasil até ao momento só se conhece espécies do género *Rhodnius* silváticas. Tanto o *Rhodnius prolixus* como o *Triatoma infestans* são espécies com colónias domiciliárias - teto, fendas nas paredes, colchões, atrás de quadros - nitidamente antropofílicas, com elevada taxa de infeção do homem. Fora da casa do homem, os triatomíneos dos géneros *Triatoma* e *Panstrongylus* estão associados a locais com rochas, abrigos de animais e troncos de árvores ocos e as do género *Rhodnius*, a palmeiras (Guhl, 2007). Espécies de triatomíneos *Triatoma* e *Paratriatoma* estão representadas na figura 2.



**Figura 2** - Fotografias de espécies de triatomíneos *Triatoma* e *Paratriatoma*. O tamanho da foto relativo à escala representa o tamanho médio de cada espécie. Adaptado de Bern et al, 2011.

### 2.3. Medidas de controlo e eliminação da doença de Chagas

Até ao momento não existe vacina para a doença de Chagas, fazendo das medidas de controlo da transmissão o único meio de prevenir a doença (Dias, 2009). Em áreas endémicas onde a principal forma de transmissão é vetorial, as medidas de controlo da doença incidem sobretudo sobre o vetor (Mandal, 2014). O controlo do triatomíneo faz-se pela educação da população, melhoramento das condições e higiene da habitação, afastamento das habitações de galinheiros, chiqueiros e currais, pulverização dos domicílios infestados com inseticidas residuais e por lavar e cozinhar bem os alimentos para evitar a sua contaminação com as fezes do vetor (Coura, 2013; Dias, 2009).

Em áreas não endémicas tais como EUA, Canadá, Europa, Ásia, Austrália, onde não há transmissão vetorial, os casos de doença de Chagas são de indivíduos que migram de áreas endémicas. Nestas áreas o controlo da doença faz-se pelo rastreio do sangue doado e dos órgãos para transplantes e o diagnóstico atempado de mulheres infetadas de forma a prevenir a transmissão vertical (Dias, 2009; Coura, 2013; Coura et al, 2014). Nos países não endémicos, ao contrário da maioria dos países da América Latina, não é obrigatório o rastreio da doença nos bancos de sangue (Moncayo & Silveira, 2009), os profissionais de saúde não estão alerta para os sinais e sintomas da doença e não a consideram ao fazer o diagnóstico diferencial. Os migrantes com frequência têm barreiras económicas e administrativas aos cuidados de saúde, o que atrasa um possível diagnóstico (Jackson, 2014). Em Portugal, o Instituto Português do Sangue e Transplantação faz a triagem do sangue doado para a doença de Chagas por quimioluminescência desde 2015.

Iniciativas de controlo multinacionais tais como as do Cone do Sul (INCOSUR) dos países andinos (IPA), dos países da América Central e México e da Amazônia (AMCHA), com o apoio técnico da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), o empenho continuado dos estados membros e o apoio de parceiros internacionais, pondo em prática as medidas já referidas conseguiram uma redução importante da transmissão do parasita pelo principal vetor intra-domiciliário e por transfusão sanguínea. O número de novos casos diminuiu em 70% (700 000 casos por ano em 1983), o número de mortes anuais em 50%, foi interrompida a transmissão de *T.*

*cruzi* pelo principal vetor na América do Sul - *Triatoma infestans* - no Uruguai em 1997, Chile em 1999, Brasil em 2006, na região oriental do Paraguai em 2008 e nos departamentos peruanos de Tacna e Monquegua em 2009 e 2010, respectivamente. Até 2010 também foi conseguida a interrupção da transmissão de *T. cruzi* pelo *Rhodnius prolixus* em todos os países da América Central, incluindo a Costa Rica, El Salvador e México. E ainda, 19 dos 21 países da América Latina conseguiram a triagem de 100% do sangue doado (Moncayo & Silveira, 2009; Coura, 2013; Coura et al, 2014; WHO Epid., 2015).

Não é possível erradicar a doença de Chagas uma vez que o seu agente etiológico se mantém na natureza em inúmeros reservatórios (animais silváticos) e vetores (triatomíneos), que são impossíveis de controlar ou eliminar e a sua transmissão existe com ou sem a presença do homem (Dias, 2009; Moncayo & Silveira, 2009; Coura, 2013). Ainda assim, de acordo com a OMS, a doença de Chagas deverá ser eliminada do Continente Americano até 2020 (WHO Report, 2015).

### 2.4. O agente etiológico da doença de Chagas

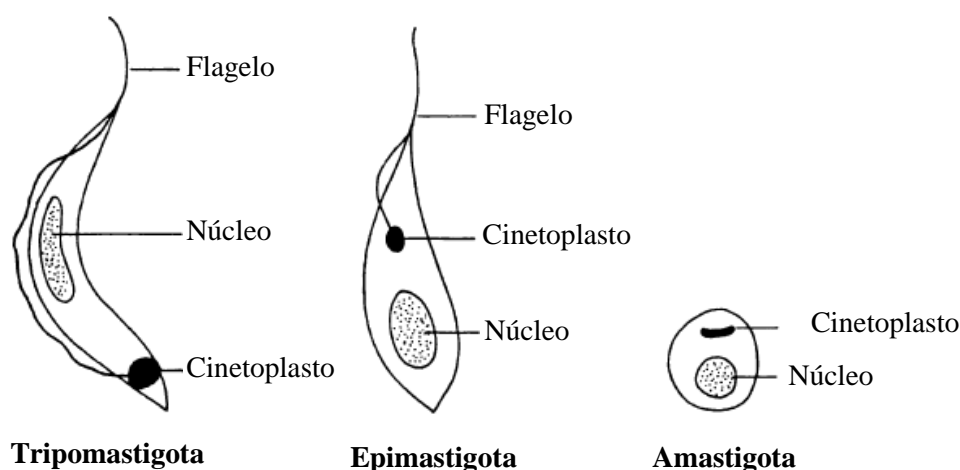
O agente etiológico da Doença de Chagas é *T. cruzi*, um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Mandal, 2014). Tem um flagelo e uma mitocôndria alongada que termina no cinetoplasto que contem o DNA mitocondrial. É um protozoário pequeno com cerca de 16,3-21,8 µm de comprimento, incluindo o flagelo (de Souza, 1999; Araújo et al, 2009). Durante o seu ciclo de vida, *T. cruzi* assume três formas celulares (tripomastigota, epimastigota e amastigota) que se distinguem pela posição característica do flagelo, cinetoplasto e núcleo (Mandal, 2014).

A sua membrana é revestida por proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) tais como as *trans*-sialidases (TS), mucinas que atuam na adesão e invasão das células do hospedeiro e na fuga ao sistema imune do mesmo (Cardoso et al, 2016; Nogueira et al, 2015).

*T. cruzi* pode parasitar uma grande variedade de células, mas apresenta um claro tropismo para células neuronais e células musculares cardíacas e esqueléticas (Haberland et al,

2013). O tropismo parasitário por definição é a invasão preferencial de um tipo celular por um determinado clone de *T. cruzi*, mas tendo em conta que os tecidos de um hospedeiro com doença de Chagas respondem de forma muito variável ao parasita, a nova definição de tropismo considera que este é o resultado da interação de um dado clone de *T. cruzi* num dado indivíduo e que depende maioritariamente da genética do parasita e do hospedeiro (Álvarez et al, 2014).

*T. cruzi* tem uma grande variedade genética, sendo-lhe conhecidas mais de 6000 estirpes organizadas em seis linhagens - *Discrete Typing Units* (DTUs). As linhagens genéticas têm o nome de TC-I a TC-VI, das quais a TC-I e TC-II são puras e as restantes são híbridas. A TC-I é predominantemente silvática e está associada a doença humana no México e na América Central e a TC-II predominantemente doméstica e ocorre na maioria da América do Sul, incluindo Argentina. A estirpe Y pertence à linhagem genética TC-II. Cada linhagem tem sido associada a um nicho ecológico, a uma determinada espécie de vetor, ciclo de transmissão silvático ou doméstico, a uma área geográfica e a uma forma crónica indeterminada ou crónica sintomática da doença de Chagas (Messenger et al, 2015; Brenière et al, 2016).



**Figura 3** - Ilustração das formas morfológicas que *T. cruzi* assume durante o seu ciclo de vida. Adaptado de autor desconhecido.

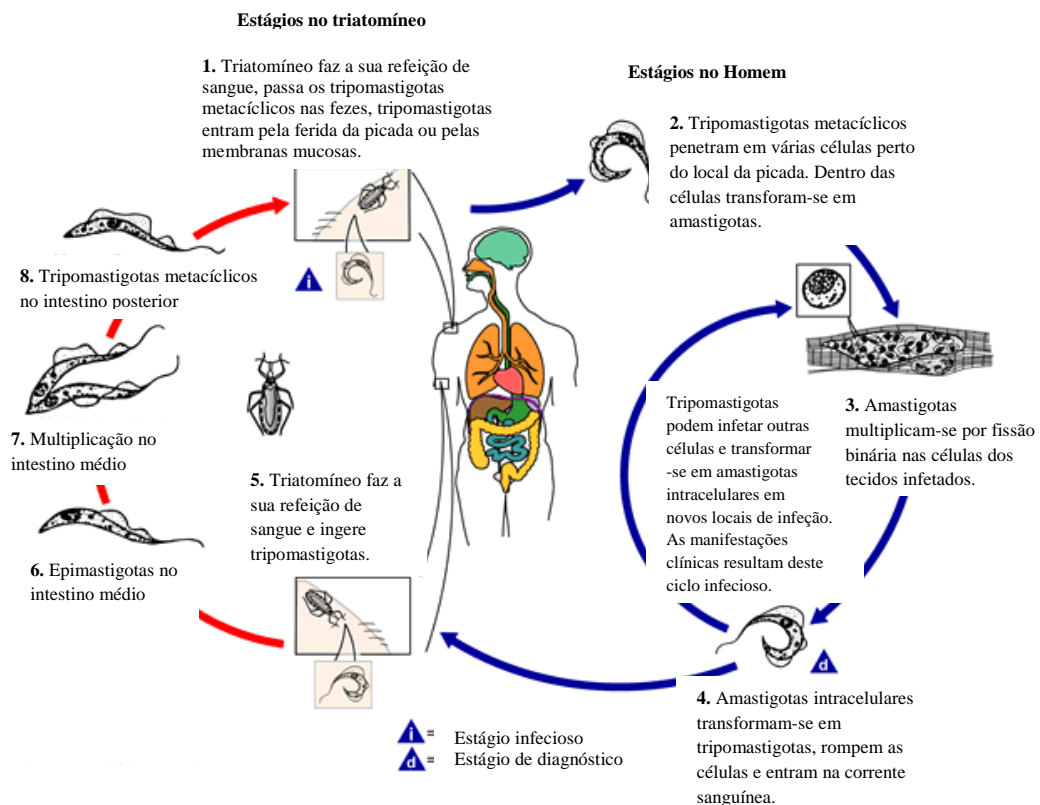


O ciclo de vida de *T. cruzi* é heteroxeno, tem uma fase no hospedeiro vertebrado - fase de multiplicação intracelular - e uma fase no inseto vetor - fase extracelular. No momento da refeição de sangue de um hospedeiro infetado, o triatomíneo ingere a forma circulante do parasita, os tripomastigotas. Estes, quando atingem o intestino posterior do vetor, diferenciam-se em epimastigotas e multiplicam-se. Os epimastigotas ao atingirem o intestino posterior diferenciam-se na forma infetante do parasita, os tripomastigotas metacíclicos. No momento da refeição de sangue do hospedeiro vertebrado, o vetor defeca e urina junto ao local da picada, que no caso do homem é geralmente a face, e quando este coça a zona irritada o parasita penetra na lesão cutânea, mucosa oral ou conjuntiva. A infecção ocorre maioritariamente à noite quando o vetor está ativo e quando o hospedeiro está a dormir. Uma vez dentro do hospedeiro os tripomastigotas metacíclicos invadem as células próximas do local de inoculação e no citoplasma celular diferenciam-se em amastigotas. Os amastigotas multiplicam-se por fissão binária, com um tempo de duplicação de aproximadamente 12h, durante 4 a 5 dias. Quando a célula está repleta, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos pelo crescimento do flagelo, provocam a lise celular, invadem as células dos tecidos adjacentes e disseminam-se por via linfática e sanguínea para locais distantes. Uma vez dentro das células, o parasita volta a assumir a forma de amastigota e continua a replicação intracelular. O ciclo fica completo quando o vetor ao fazer a sua refeição de sangue ingere os tripomastigotas sanguíneos do hospedeiro vertebrado já infetado (Mandal, 2014; CDC, 2015 (Figura 4).

O hospedeiro vertebrado aparentemente pode ser qualquer mamífero silvático ou doméstico. Os reservatórios silváticos mais importantes são os marsupiais e os tatus e os peri-domésticos e domésticos, os ratos, camundongos, cães e gatos. A taxa de prevalência de *T. cruzi* em porcos, cavalos, bois e cabras é regra geral muito baixa. Dependendo do hospedeiro vertebrado infetado pelo parasita, o seu ciclo de vida poderá ser silvático, peri doméstico ou doméstico (Mandal, 2014).

### 2.5. Formas de transmissão da doença de Chagas

A principal forma de transmissão das Tripanossomose Americana é pelo inseto vetor, uma forma de transmissão que ocorre exclusivamente no Continente Americano (Bern, 2015; Mandal, 2014). A transmissão pela picada do triatomíneo está associada às zonas rurais e periurbanas com saneamento básico inadequado, onde as habitações são de construção pobre, feitas de barro (pau a pique), pedras, paredes de madeira com fendas, cobertas por vegetação e folhas de palmeira que propiciam o estabelecimento e consequente contacto com o triatomíneo (Coura, 2013; WHO Epid., 2015).



**Figura 4** - Ciclo de vida de *T. cruzi*. O inseto vetor, triatomíneo faz a sua refeição de sangue e liberta tripomastigotas nas suas fezes perto do local da picada. Tripomastigotas entram no hospedeiro pela ferida da picada ou pelas mucosas, como a conjuntiva **1**. Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem células perto do local de inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares **2**. Os amastigotas multiplicam-se por fissão binária **3**, e diferenciam-se em tripomastigotas e são libertados na circulação como tripomastigotas sanguíneos **4**.

Tripomastigotas infetam células de uma variedade de tecidos e transformam-se em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção. As manifestações clínicas podem resultar deste ciclo infeccioso. Os tripomastigotas sanguíneos não se replicam. A replicação só acontece quando os parasitas entram noutra célula ou são ingeridos por outro vetor. O triatomíneo é infetado ao alimentar-se do Homem ou de um animal que tem parasitas circulantes. Os tripomastigotas ingeridos transformam-se em epimastigotas no intestino médio do vetor **6**. Os parasitas multiplicam-se e diferenciam-se no intestino médio **7**, e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior **8**.

Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

Esta forma de transmissão é na verdade pouco eficaz (Nouvellet et al, 2013; Bern, 2015). A percentagem de novos casos é de menos de 1% a 4% no Chaco Boliviano hiperendémico. Num meio endémico a população que vive nas habitações infestadas é exposta continuamente ao vetor e ao parasita ao longo dos anos, neste contexto uma larga percentagem da população pode ser chagásica e encontrar-se na fase crónica da doença (Bern, 2015).

Em áreas onde há transmissão intra-domiciliária o triatomíneo pica sobretudo crianças com menos de 5 anos e em áreas onde não existe, a doença atinge maioritariamente crianças mais velhas, estando associada a atividades ao ar livre, agricultura, pesca e caça (WHO Epid., 2015; WHO Report, 2015).

A doença de Chagas também pode ser adquirida pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas, uma forma de transmissão que tem ganho importância nos últimos anos com a ocorrência de microepidemias na região da Amazônia associadas ao consumo de açaí, fruto da palmeira e sumos de cana (caldo de cana) e goiaba (Andrade et al, 2014).

Em países não endémicos os casos de doença de Chagas estão na sua maioria associados à transmissão por transfusão sanguínea, congénita e menos frequentemente a transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e por relações sexuais (Pereira e Navarro, 2013; WHO Epid., 2015). Estão descritos casos raros da aquisição da doença em viajantes. Esta doença não afeta preferencialmente nenhum género. Existem, contudo, variações locais que dizem respeito à exposição às diferentes formas de transmissão (WHO Epid., 2015)

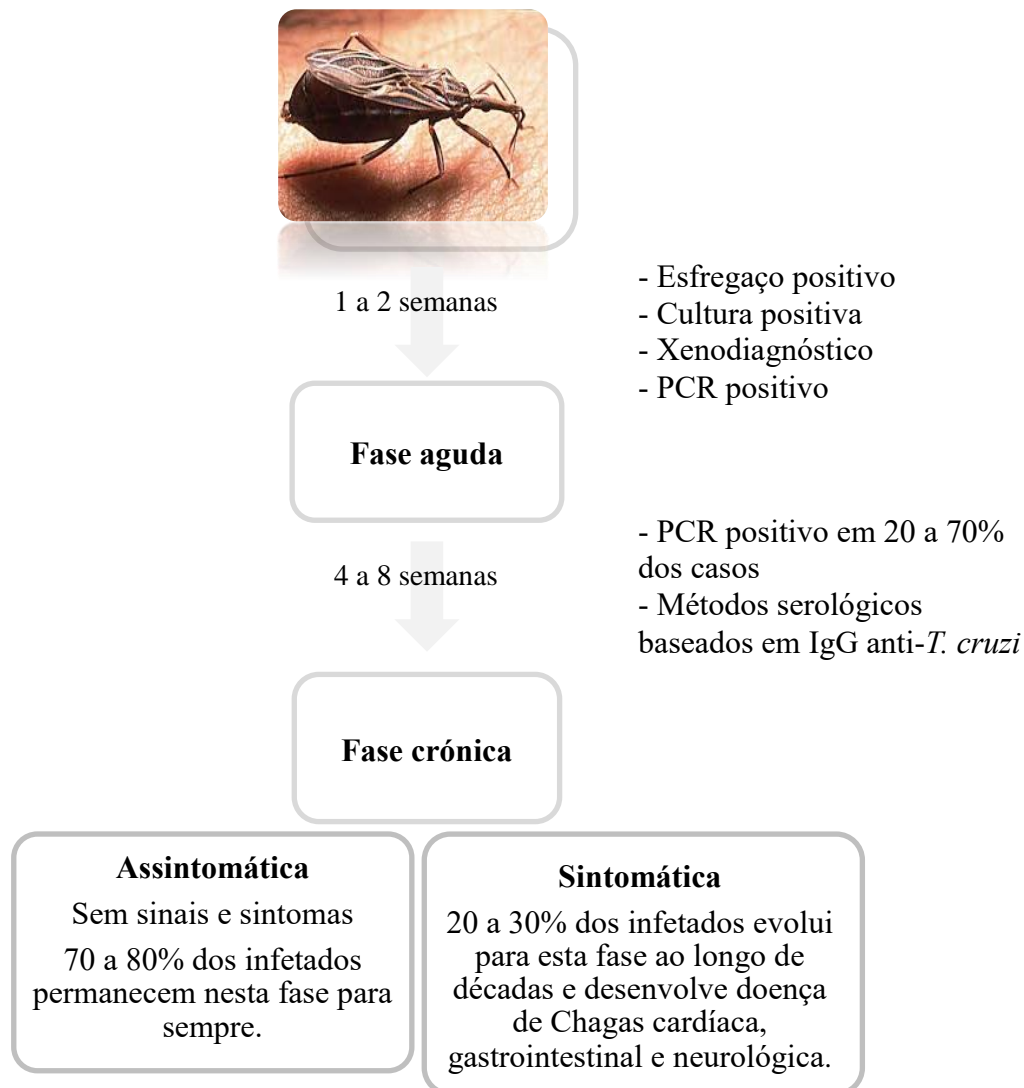
### 2.6. Manifestações clínicas da doença de Chagas

Tendo em conta a sua evolução clínica, a doença de Chagas é considerada uma doença bifásica, com uma fase aguda que ocorre 8 a 10 dias após a infeção e pode durar 4 a 8 semanas e uma fase crónica que pode ter início 10 a 30 anos após a fase inicial e ser vitalícia. A fase aguda corresponde ao momento em que os tripomastigotas sanguíneos se multiplicam no sangue periférico do hospedeiro vertebrado. Esta fase raramente é observada uma vez que apenas 5% dos indivíduos são sintomáticos e a maioria dos sintomas inespecíficos. Após a inoculação, o primeiro sinal, caso ocorra, é edema no local onde o parasita penetrou na pele – chagoma de inoculação. 1 a 2% dos indivíduos apresentam um sinal característico, edema unilateral na pálpebra do olho, indolor – sinal de Romana – que pode ser acompanhado do aumento das glândulas linfáticas e febre. Outros sintomas incluem calafrios, mal-estar, dores de cabeça, dores musculares e fadiga (síndrome de mononucleose) que são frequentemente atribuídos a outra causa (Andrade et al, 2014).

Em menos de 1% dos casos esta fase pode ser severa e manifestar-se em miocardite aguda, efusão pericárdica e meningoencefalite (Nunes et al, 2013; Mandal, 2014; Messenger et al, 2015). Doença aguda severa tipicamente ocorre em crianças até aos 10 anos e é muitas vezes mortal devido a complicações decorrentes de miocardite aguda, meningoencefalite grave ou ambos. Também indivíduos com VIH/SIDA frequentemente manifestam meningoencefalite (Bern, 2015; Messenger et al, 2015; WHO Epid., 2015) e indivíduos infetados com uma elevada dose de inóculo como os que ingerem alimentos ou bebidas contaminadas com as fezes do vetor têm uma elevada incidência de miocardite e a uma taxa de mortalidade mais elevada do que os infetados pela picada do vetor (Bern, 2015; WHO Epid., 2015).

70 a 80% dos pacientes que sobrevivem à fase aguda vão evoluir para a fase crónica e permanecer numa forma clínica indeterminada assintomática, uma fase crónica considerada protetora. Os restantes progridem para uma fase crónica sintomática patogénica (Andrade et al, 2014). Os danos provocados pela presença do parasita nos tecidos vão refletir-se em falência cardíaca, arritmias, anomalias da condução cardíaca, fenómenos tromboembólicos, aneurisma apical, morte súbita e ainda manifestações gastrointestinais (megaesófago e megacólon) e neurológicas (principalmente AVC por tromboembolismo mas também alterações degenerativas do encéfalo e cerebelo) (Nunes

et al, 2013; Messenger et al, 2015). As manifestações clínicas dependem da genética do parasita e do hospedeiro e em particular da sua resposta imune, incluindo a capacidade de controlar a parasitemia, a eficácia da resposta inflamatória e a existência de resposta autoimune (Ayo et al, 2015).



**Figura 5** - Evolução Clínica da doença de Chagas e métodos de diagnóstico disponíveis em cada fase. A fase aguda da doença caracteriza-se pela parasitemia detetada microscopicamente. Na fase crónica da infeção o diagnóstico é centrado em métodos serológicos que detetam anticorpos IgG. 70 a 80% dos pacientes que sobrevivem à fase aguda vão evoluir para a fase crónica e permanecer numa forma clínica indeterminada assintomática protetora. Os restantes progridem para uma fase crónica sintomática patogénica. Adaptado de Bern (2015).

### 2.7. Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas

#### 2.7.1. Diferentes métodos de diagnóstico

Na fase aguda da infecção, só uma pequena percentagem dos doentes é sintomática e a maioria dos sintomas são inespecíficos o que torna o diagnóstico um desafio (Andrade et al, 2014). Nesta fase, ou quando há reativação da doença devido a imunossupressão, o parasita pode ser demonstrado diretamente a fresco, em gota espessa ou esfregaço corado. Quando a pesquisa direta é negativa pode-se recorrer a técnicas de concentração do sangue tais como Strout, microhematócrito e creme leucocitário que têm uma sensibilidade de 80 a 90% (Gomes et al, 2009; Mandal, 2014). Em doentes imunodeprimidos o diagnóstico é confirmado por um teste Strout positivo (Mandal, 2014).

A hemocultura do parasita em meio *liver-infusion tryptose* (LIT) é um método mais sensível do que os exames diretos, mas raramente é utilizado no diagnóstico da infecção aguda pela sua morosidade, podendo levar mais de um mês a produzir resultados. Um outro método de diagnóstico é a exposição do doente de forma direta ou indireta a um triatomíneo – xenodiagnóstico (Pereira e Navarro, 2013).

A presença de anticorpos do tipo IgM anti-*T. cruzi* no sangue periférico é um indicador de infecção patente, no entanto os ensaios serológicos baseados em IgM não estão padronizados nem amplamente disponíveis ainda assim, o teste Imunofluorescência Indireta (IFI) baseado em anticorpos IgM anti-*T. cruzi* pode ser uma ferramenta de diagnóstico importante nesta fase da infecção (Vasconcelos et al, 2011; Mandal, 2014).

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é uma técnica molecular que deteta e amplifica sequências de ADN específicas, que no diagnóstico da doença de Chagas, são sequências de ADN do parasita em amostras de sangue de indivíduos com suspeita de doença (Mandal, 2014). Nesta fase é um método mais sensível do que os testes parasitológicos diretos e indiretos (Gilber et al, 2013; Mandal, 2014) e com uma especificidade consistente de 100% (Brasil et al, 2016). Contudo, não é um método padronizado e é caro. Existe um teste PCR comercial, mas não está amplamente disponível e requer técnicos especializados para o seu manuseamento. O seu uso é recomendado no diagnóstico da

infecção congênita de uma amostra do cordão umbilical ou sangue periférico colhido aos 2 meses de idade de um bebê nascido de mãe seropositiva e na avaliação do tratamento antiparasitário - um teste PCR positivo traduz-se numa falha da terapêutica (Mandal, 2014).

Entre a 6<sup>a</sup> e a 10<sup>a</sup> semana de infecção a parasitemia diminui para níveis quase indetectáveis tornando difícil a observação do parasita no sangue. Nesta fase, a hemocultura e o xenodiagnóstico embora específicos têm baixa sensibilidade (20-50%) e pouca utilidade no diagnóstico (Gomes et al, 2009).

Na fase crônica da infecção o diagnóstico é centrado em métodos serológicos que detetam anticorpos do tipo IgG anti-*T. cruzi*. Os mais utilizados são o *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Imunofluorescência Indireta (IFI) e Hemaglutinação Indireta (HI) (Messenger et al, 2015). A técnica serológica de eleição é o ELISA devido à sua elevada sensibilidade e especificidade (Santos et al, 2012), descritos num artigo de revisão como acima de 90% em todos os estudos (Brasil et al, 2016). Outros testes serológicos menos convencionais, que geralmente são utilizados em laboratórios de referência ou de investigação, incluem o recELISA, Immunoblotting, citometria de fluxo e imunossensores (Ibrahim et al, 2015; Messenger et al, 2015).

Na fase crônica da doença, a sensibilidade do PCR é limitada pelos baixos níveis de parasitemia característicos (Mandal, 2014; Brasil et al, 2016) ainda assim, este pode ser útil em laboratórios de referência ou de investigação em casos específicos e/ou como apoio aos testes de diagnóstico serológicos (Gilber et al, 2013; Brasil et al, 2016).

A quimioluminescência é um método não convencional que pode ser usado nesta fase. É um ensaio imunoenzimático para a deteção qualitativa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. O teste requer dois passos: amostras e diluentes são misturados com micropartículas paramagnéticas revestidas com antígenos de *T. cruzi*. O anticorpo secundário é marcado com acridina e a quimioluminescência é medida em unidades de luz relativas. (Pereira & Navarro et al, 2013)

### 2.7.2. Métodos de diagnóstico e antígenos de *T. cruzi*

A superfície de *T. cruzi* é revestida por um conjunto de proteínas que induzem a produção de várias classes de anticorpos em humanos (Cardoso et al, 2016) e como tal o seu estudo é de grande interesse na medida em que podem ser a chave para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico mais eficaz ou de uma vacina.

Nem todas as proteínas de *T. cruzi* são úteis no diagnóstico da doença. Estas devem estar presentes em isolados de *T. cruzi* de diferentes áreas endémicas, ausentes em agentes etiológicos de outras doenças infecciosas, devem ser altamente imunogénicas em populações com diferentes características genéticas, estar presentes em todas as fases clínicas da doença, serem estáveis e facilmente sujeitas a testes de controlo de qualidade (Gomes et al, 2009).

Sabe-se que durante o seu ciclo de vida, *T. cruzi* assume três formas com diferentes constituições proteicas (Kloetzel et al, 1975; Santiago et al, 1981; Primavera et al, 1990) e por isso o estágio de vida do parasita utilizado como antígeno nos testes de diagnóstico, influencia a sensibilidade e especificidade do teste (Guzmán-Gómez et al, 2015; Santos et al, 2016).

Os testes serológicos convencionais são baseados na deteção de antígenos de *T. cruzi* epimastigota. Por só existirem no intestino do vetor, os epimastigotas são um estágio do parasita mais seguro e porque é possível obter um grande número de epimastigotas num meio de cultura axénico, são mais fáceis e baratos de produzir (Santiago et al, 1981; Zingales & Colli, 1985; Primavera et al, 1990; de Sousa, 2009; Santos et al, 2016;). Os testes serológicos menos convencionais utilizam antígenos de tripomastigotas e amastigotas (Messenger et al, 2015).

Os antígenos usados nos testes de diagnóstico podem ser de extratos totais do parasita, antígenos puros, semi puros ou recombinantes (Gomes et al, 2009; Bottino et al 2013). Sabe-se que os antígenos recombinantes são mais fáceis de reproduzir e padronizar (Guzmán-Gómez et al, 2015) e têm maior especificidade que os extratos totais ou purificados (Benedetti et al, 2013). Reações cruzadas com antígenos do género *Leishmania* e da espécie *Trypanosoma rangeli* são uma preocupação no que respeita à sensibilidade dos testes serológicos para o diagnóstico de *T. cruzi* (Bottino et al, 2013;



Gilber et al, 2013) sobretudo quando baseados em extratos totais ou semi purificados de epimastigotas (Bottino et al, 2013).

De acordo com a OMS, para um diagnóstico de confiança são necessários dois testes serológicos positivos, de preferência de diferentes tipos e com diferentes preparações de antígenos (Mandal, 2014; Messenger et al, 2015; Granjon et al, 2016).

Alguns antígenos recombinantes atualmente usados são o antígeno de fase aguda libertado (SAPA), o antígeno de superfície pequeno tripomastigota (TSSA), antígeno repetido flagelar (FRA) e o antígeno repetido citoplasmático (CRA) (Benedetti et al, 2013). O CRA e o FRA são dois exemplos de antígenos bem caracterizados. O CRA é uma proteína com 225 kDa constituída por 14 repetições de aminoácidos que estão distribuídas no citoplasma da forma epimastigota de *T. cruzi* e o FRA é uma proteína de 300 kDa com 68 aminoácidos repetidos que está localizada no flagelo de todas as formas de vida do parasita. Estes antígenos foram combinados e utilizados em testes ELISA (Rec-ELISA) e revelaram alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico da doença de Chagas (Gomes et al, 2009; Bottino et al, 2013). Uma ELISA baseada em antígenos CRA teve 100% de sensibilidade e especificidade, enquanto a ELISA com antígenos FRA demonstrou ser menos sensível (91,5%) e específica (60%) (Bottino et al, 2013; Mandal, 2014).

Um Immunoblotting baseado em antígenos de tripomastigota excretados-secretados (TESA-Blot) (150-160 kDa) teve 100% de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da infecção (Gomes et al, 2009; Mandal, 2014). O seu uso foi proposto para quando existe suspeita de doença de Chagas aguda, congênita ou como auxiliar da serologia convencional (Gomes et al, 2009). Infelizmente, esta técnica não é adequada para testar uma grande quantidade de amostras (Gomes et al, 2009; Mandal, 2014).

Por outro lado, um teste ELISA baseado em antígenos de tripomastigota excretados-secretados (TESA-ELISA) utilizando soros de indivíduos saudáveis, com doença de Chagas, com Leishmânia cutânea e visceral, a sua sensibilidade e especificidade foi de 100%. A TESA-ELISA é mais útil do que o TESA-Blot porque é mais simples, fácil de executar e suscetível de ser automatizada (Gomes et al, 2009).

### 2.8. Imunologia da doença de Chagas

#### 2.8.1. Resposta imune a *Trypanosoma cruzi*

Uma a duas semanas após a inoculação do parasita tem início a fase aguda da infecção. Os recetores *toll-like* presentes à superfície dos macrófagos e células dendríticas, quando em contacto com as moléculas de superfície de *T. cruzi* vão ativar células suas semelhantes e outras células da imunidade inata tais como os linfócitos *Natural Killer* (NK) e neutrófilos e montar uma resposta inflamatória que irá controlar a parasitémia de forma dramática (Andrade et al, 2014; Cunha-Neto & Chevillard, 2014; Bern, 2015).

Ainda não é claro de que forma este controlo acontece em humanos (Andrade et al, 2014) mas pensa-se que as células da imunidade inata quando ativas secretam citocinas pró-inflamatórias - fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferão gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucinas (ILs) – que vão ativar outras células, expressam recetores co-estimulatórios, aumentam a endocitose e a morte intracelular do parasita pela produção de oxigénio reativo e espécies de azoto (Andrade et al, 2014; Cunha-Neto & Chevillard, 2014; Cardillo et al, 2015; Cardoso et al, 2016).

Os macrófagos e as células dendríticas que endocitaram *T. cruzi* vão desencadear uma resposta imune humoral e celular na qual vão ser produzidos linfócitos T e B (Cunha-Neto & Chevillard, 2014). Na maioria dos doentes a resposta imune adaptativa consegue conter a multiplicação do parasita, levando a uma diminuição dramática da parasitémia no sangue, mas falha na sua eliminação total o que leva à progressão da doença para uma fase crónica (Ayo et al, 2013; Bern, 2015).

Estudos recentes sugerem que a produção predominante de citocinas regulatórias como o IL-10 ou de citocinas pro-inflamatórias como o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no final da fase aguda, estão associadas à entrada numa fase crónica protetora assintomática ou numa fase crónica patogénica, respetivamente (Andrade et al, 2014; Bern, 2015).

Na fase crónica assintomática o único indício de infecção é a serologia positiva para IgG anti-*T. cruzi* (Vasconcelos et al, 2011). Esta fase representa o equilíbrio entre o parasita

e o sistema imune do hospedeiro (Dutra et al, 2009; Vasconcelos et al, 2011; Andrade et al, 2014).

Na fase crónica patogénica progride-se ao longo do tempo para doença de Chagas cardíaca, digestiva e/ou gastrointestinal. Existem várias hipóteses que procuram explicar a patogénese da doença de Chagas cardíaca (Fabbro et al, 2011; Ayo et al 2015; Bern, 2015) mas existe consenso de que a persistência do parasita nos tecidos do miocárdio é crucial (Virgilio, 2014; Bern, 2015). A permanência prolongada do parasita nos tecidos resulta numa resposta inflamatória crónica, alterações na microcirculação e comprometimento do sistema nervoso autónomo (Fabbro et al, 2011; Ayo et al, 2013) e leva o sistema imune a perder tolerância aos tecidos do próprio (Dutra et al, 2009; Fabbro et al, 2011; Bern, 2015).

### 2.8.2. Resposta imune humoral – Produção de anticorpos anti-*T. cruzi*

Uma semana ou duas após o início da infeção, no final da fase aguda da doença, *T. cruzi* provoca a ativação policlonal das células B, diferenciam-se em células plasmáticas que irão dar origem aos anticorpos solúveis ou imunoglobulinas (Andrade et al, 2014; Cardoso et al, 2016).

A primeira imunoglobulina a ser produzida é a IgM. Após 15 dias de infeção por *T. cruzi*, esta imunoglobulina abunda no soro dos pacientes e é usada como um marcador serológico. Na fase inicial da infeção também é possível detetar IgG anti-*T. cruzi* mais especificamente IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Na fase crónica deteta-se sobretudo IgG2a (Andrade et al, 2014; Cardoso et al, 2016).

Não se conhece ao certo o papel das células B na doença de Chagas, mas sabe-se que estas células produzem anticorpos, apresentam antigénios a células T e secretam citocinas. Pensa-se que as células B têm o potencial de modular a resposta imune pela regulação do perfil de citocinas secretadas (Cardillo et al, 2015; Nogueira et al, 2015).

### **3. Objetivos do estudo**

### 3. Objetivos do estudo

#### 3.1. Questão de investigação

Quais os antígenos de *T. cruzi* responsáveis pela indução e manutenção da resposta imune humoral durante o desenvolvimento da doença de Chagas.

#### 3.2. Objetivo Geral

Caracterizar a reatividade serológica de antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y em soros de indivíduos com doença de Chagas.

#### 3.3. Objetivos específicos

1. Determinar os níveis de anticorpos do tipo IgG total e IgM anti-*T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y nas amostras de doentes com doença de Chagas.
2. Identificar os antígenos de *T. cruzi* responsáveis pela indução da resposta imune humoral nos doentes com doença de Chagas aguda e crónica.

## **4. Material e métodos**

### 4. Material e métodos

#### 4.1. Cultura de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A estirpe Y de *T. cruzi* foi isolada de um caso agudo de doença de Chagas por Silva e Nussenzweig em 1953. Os parasitas da forma tripomastigota da estirpe Y foram obtidos pela diferenciação da forma epimastigota. Para tal, foi adicionado 1 ml da cultura de epimastigotas pré-estabelecida a um tubo cônico de 15 ml com 9 ml de meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,5% de antibiótico. A cultura foi mantida em estufa a 24°C durante 25 dias de acordo com o protocolo estabelecido por Monteiro (2015).

#### 4.2. Extração e quantificação das proteínas totais

Para a extração das proteínas *T. cruzi* tripomastigota, quando o cultivo atingiu a fase estacionária de crescimento após 25 dias, foi retirada do meio LIT, lavada com 25 ml de tampão fosfato (PBS) e centrifugada 3000 rpm a 4°C durante 10 min. Os sedimentos (*pellets*) foram lavados com PBS e centrifugados a 3000 rpm a 4°C durante 10 min, três vezes. Após as lavagens os extratos foram ressuspensos em PBS e sujeitos a lise mecânica por seis ciclos de congelação e descongelação a -20°C e foram preservados à mesma temperatura até a sua utilização.

Para a determinação da concentração das proteínas totais do extrato de *T. cruzi* utilizou-se o método de Bradford, um ensaio colorimétrico baseado na interação entre o azul de Coomassie brilhante BG-250 e os aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas das proteínas. A interação entre a proteína e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve a um comprimento de onda de 595 nm. Este método usa uma curva padrão baseada no intervalo linear, do soro de albumina bovina, que se situa entre os 125 e os 1000 µg/ml (Bradford, 1976). Foram utilizadas três placas de microtitulação (BRANDplates®, BRAND, Alemanha) cada uma com diluições sucessivas da solução *stock* de 10 mg/ml de soro de albumina bovina (BSA)

diluída em PBS no intervalo de 125 a 2000 µg. Todos os poços foram preenchidos com 250 µl de reagente de Bradford (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent - Bio-Rad, EUA) e com 5 µl de um padrão. À semelhança dos padrões, cada amostra foi testada em triplicado. Todos os poços foram preenchidos com 250 µl de reagente de Bradford e com 5 µl da amostra diluída 5X e 10X. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente procedeu-se à leitura das absorvâncias das amostras no comprimento de onda de 570 nm e inferiu-se a concentração de cada extrato traçando uma reta de regressão linear com os valores de densidade ótica, de acordo com o protocolo estabelecido por Pineda (2015).

### 4.3. População em estudo e dimensão da amostra

Os 370 soros utilizados no estudo pertencem à soroteca de doença de Chagas da Unidade de Ensino e Investigação Clínica de Doenças Tropicais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa. Os soros foram previamente estudados quanto à presença de anticorpos anti-*T. cruzi* por Pineda (2015), utilizando os testes comerciais ELISA indireto Gold ELISA Chagas REM® Indústria e Comércio LTDA e ORTHO® *T. cruzi* ELISA Test System. dos quais resultaram 330 indivíduos seropositivos e 50 seronegativos. As amostras de indivíduos com serologia positiva pertencem a indivíduos que provêm da América Latina que vivem na Europa: Argentina (111), Brasil (37), Cuba (13), México (74) e Espanha (95).

### 4.4. Considerações éticas

Este estudo tem como base o trabalho desenvolvido anteriormente por Pineda (2015) previamente aprovado pelo Conselho de Ética do IHMT-UNL. Os soros utilizados pertencem a pacientes diagnosticados com doença de Chagas provenientes da Argentina, Brasil, Cuba, Espanha e México. As amostras de soro foram obtidas no período de 2008 a 2012 com aprovação prévia dos comités de ética dos respetivos países.

A base de dados utilizada é anónima, não põe em risco o bem-estar ou segurança dos participantes e não implica a confidencialidade dos pacientes. O investigador responsável



compromete-se a não permitir o uso dos soros para razões não especificadas neste protocolo e a não emprestar as amostras a outros investigadores ou instituições.

### 4.5. Determinação de anticorpos anti-*T. cruzi* por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Para a determinação dos títulos de anticorpo do tipo IgG total anti-*T. cruzi*, foram revestidos os poços de uma microplaca (BD FALCON™, EUA) com 100 ng/poço de extrato proteico total de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y, dissolvido em tampão bicarbonato 0,1M pH 8.5 durante a noite em atmosfera húmida a 5°C. No dia seguinte, a solução de revestimento foi revestida e lavou-se a placa três vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05% (v/v)). Na etapa de bloqueio, pipetou-se 200 µl/poço de tampão de bloqueio (PBS-Tween 0,05% - leite magro em pó Nestlé® 1%) à temperatura ambiente. Ao fim de 1h lavou-se a microplaca três vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem. A seguir, adicionou-se 100 µl/poço das amostras de soros diluídos 1:200 (v/v) em tampão de anticorpo (PBS-Tween 0,05% - leite magro em pó Nestlé® 0,05%) que foi incubado durante 1h à temperatura ambiente. A seguir lavou-se a microplaca 5 vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem. A microplaca foi incubada com 100 µl/poço de anticorpo secundário anti-IgG humano conjugada a peroxidase - Bio Rad diluído 1:10 000 (v/v) em tampão de anticorpo, durante 1h à temperatura ambiente.

A microplaca foi lavada 5 vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem e incubada com 100 µl/poço de 10 mg dicloridrato de o-fenilenodiamina - Sigma-Aldrich dissolvida em 10 ml tampão citrato 0,1M pH 5 e 10 µl de peróxido de hidrogénio durante 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Adicionou-se 50 µl/poço de solução STOP (ácido sulfúrico 4N) para interromper a reação e procedeu-se à leitura da absorvância no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 490 nm.

Para a determinação de anticorpos do tipo IgM anti-*T. cruzi*, o procedimento foi idêntico ao realizado para a determinação de anticorpos do tipo IgG total, até ao momento em que a microplaca foi incubada com 100 µl/poço de solução de anticorpo secundário anti-IgM humano conjugado a fosfatase alcalina - Sigma-Aldrich diluído 1:10 000 em tampão de

anticorpo durante 1h à temperatura ambiente. A microplaca foi lavada 5 vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem e incubada com 100 µl/poço de 20 mg de 4-nitrofenil fosfato (pNPP) dissolvido em 20 ml de tampão de glicina (0.1M tampão de glicina, pH 10,4: 7,51g glicina, 203 mg MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> e 980 ml de H<sub>2</sub>O) durante 30 min à temperatura ambiente. Adicionou-se 50 µl/poço da solução STOP hidróxido de sódio 3N para interromper a reação e procedeu-se à leitura da absorvância no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 415 nm.

Os valores de densidade ótica (DO) resultantes da leitura foram organizados e trabalhados no Microsoft Excel 2010 (Anexo 1). Foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis para comparar a reatividade serológica das amostras de soros das diferentes populações. Inicialmente o *cut-off* foi definido como a média aritmética da DO de três soros negativos usados num determinado ensaio ELISA e na análise dos resultados, para melhor distinção das amostras de soros com serologia positiva e negativa, um soro foi considerado com serologia positiva se  $DO/Cut-Off \geq 1$ . Os resultados foram representados na forma de gráficos realizados no GraphPad Prism 6.0 (Ver figura 5, 6 e 7).

### 4.6. Imunodeteção de antígenos de *Trypanosoma cruzi* por *Immunoblotting*

Preparou-se o gel de separação com 10% de acrilamida de acordo com a tabela 1 e esperou-se 30 min pela polimerização. Após a polimerização do gel de acrilamida, adicionou-se o gel de concentração de acordo com o quadro 1, colocou-se o pente e aguardou-se 10 min pela polimerização total do gel.

#### 4. Material e métodos

	H <sub>2</sub> O (ml)	Bis- acrilamida 30% (ml)	Tris-HCL 0,5 M pH 6.8 (ml)	SDS 10% (ml)	APS 30% (ml)	TEMED (ml)
gel de separação 10% acrilamida	4,1	3,3	2,5	0,1	0,05	0,005
gel de concentração	2,5	0,450	0,333	0,033	0,0166	0,0047

**Quadro 1** – Preparação do gel de separação e gel de concentração para a separação de proteínas de *T. cruzi* de acordo com a sua massa molecular.

As amostras de soro foram submetidas a uma eletroforese vertical na qual foi utilizada tampão de corrida pH 8,3 1X (1l: 3 g 250 M Tris, 14,4 g 1.92 glicina, 1 g SDS). Foram carregados 5 µl do marcador de massa molecular (*Precision plus protein<sup>TM</sup> dual color standards* - Bio-Rad, EUA) e 20 ng/poço de extrato de tripomastigota numa diluição 1:2 em tampão de amostra (50 Mm Tris-HCL pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 1%, 12,5 Mm EDTA, 0,02% azul de bromofenol). O extrato foi previamente fervido 5 min a 95°C.

A corrida eletroforética foi iniciada a 75V e após as amostras terem entrado no gel de corrida, a voltagem foi aumentada para 140V por aproximadamente 1h, até a frente de migração chegar ao fim do gel. Terminada a eletroforese, o gel foi removido da cassete e lavado rapidamente em tampão de transferência 1X (1l: 192 mM glicina, 192 mM Tris, 20% metanol) para remover o excesso de SDS.

Para a transferência de proteínas do extrato de *T. cruzi*, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, para uma membrana de nitrocelulose, foi cortada uma membrana de nitrocelulose (*Amersham<sup>TM</sup> Protran<sup>TM</sup> Premium 0.45 µm NC* - GE Healthcare) e papel filtro extra espesso (Protean xi size - Bio-Rad, EUA). A membrana foi equilibrada 15 min em tampão de transferência e o papel filtro passado por tampão de transferência. Procedeu-se à transferência em sistema semi-seco usando o *trans-blot sd semi-dry transfer cell* - Bio-Rad, EUA a 20V durante 45 min. Terminada a transferência a membrana foi guardada em PBS 1X durante a noite a 4°C.

No dia seguinte foi removido o PBS e a membrana foi bloqueada com PBS-Tween 0,05% - leite em pó magro Nestle® 1% durante 1h à temperatura ambiente. Para remover o excesso de tampão de bloqueio a membrana foi lavada duas vezes com PBS-Tween 0,05% e uma vez com PBS 1X, 10 min cada lavagem. Após a lavagem a membrana foi cortada em tiras, incubadas individualmente com 1 ml de 1:1000 em tampão de amostra PBS-Tween 20 0,05% - leite em pó magro Nestle® 0,05% durante 1h, à temperatura ambiente, sob agitação. Para otimizar a reação de immunoblotting as amostras de soros foram utilizadas inicialmente na forma de um pool, constituído pelas amostras de soros com maior reatividade serológica para IgG total anti-*T. cruzi* analisados por ELISA. Como controlo negativo foi utilizado 1 pool com 3 amostras de soros negativos para doença de Chagas. Ao fim de 1h o esquema de lavagem foi repetido e cada tira de membrana foi incubada com 1 ml anti-IgG humano conjugado com a peroxidase - Bio-Rad, diluído 1: 4000 (v/v) durante 1h, à temperatura ambiente, sob agitação. O esquema de lavagem foi repetido. Para a revelação do complexo antígeno-anticorpo utilizou-se 10 mg de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, EUA) dissolvida em 15ml de tampão Triz 0,05M, pH 7,6 e adicionado 12 µl de peróxido de hidrogénio e aguardou-se até ao desenvolvimento da cor. A reação foi terminada com a adição de água destilada.

## **5. Resultados e discussão**

## 5. Resultados e discussão

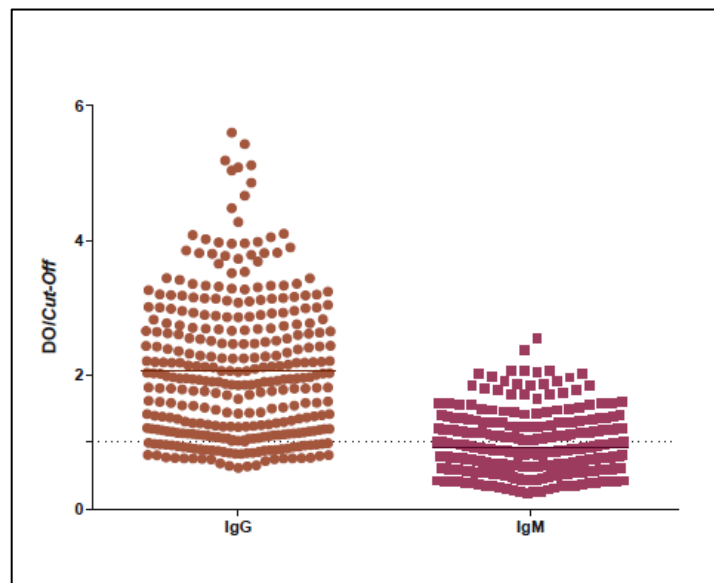
Na fase crónica da doença de Chagas a parasitémia diminui para níveis quase indetetáveis tornando difícil a observação do parasita no sangue. Nesta fase o diagnóstico da doença é centrado em métodos serológicos que detetam sobretudo anticorpos do tipo IgG anti-*T. cruzi*, dos quais a técnica de eleição é o ELISA (Gomes et al, 2009; Messenger et al, 2015). *T. cruzi* tem mais de seis mil estirpes, organizadas em seis linhagens genéticas (Brenière et al, 2016) e durante o seu ciclo de vida assume três formas com perfis antigénicos distintos o que dificulta a utilização de um único teste no diagnóstico da doença de Chagas. Atualmente a confirmação do diagnóstico requer dois testes serológicos diferentes positivos e com preparações de antígenios distintas (Messenger et al, 2015; Granjon et al, 2016).

Este estudo, tem como objetivo caracterizar a reatividade serológica dos antígenios de *T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y presentes nos soros de indivíduos com doença de Chagas. Os resultados obtidos podem contribuir para encontrar marcadores serológicos que podem ser usados no desenvolvimento de um teste único de elevada sensibilidade e especificidade e uma melhor compreensão da resposta imune humoral desenvolvida durante a doença de Chagas.

Tendo em conta o objetivo proposto foram analisados 330 soros de indivíduos com doença de Chagas da América Latina (111 da Argentina, 37 do Brasil, 13 de Cuba, 74 do México) imigrantes na Europa e 95 de Espanha. Como controlo negativo foram utilizados soros de indivíduos provenientes da América Latina, imigrantes na Europa sem história clínica de doença de Chagas. Como antígeno utilizou-se extrato total de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y.

Na etapa inicial deste estudo determinou-se os níveis de anticorpos do tipo IgG total e IgM contra os antígenios de *T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y em amostras de soros de indivíduos com história clínica de doença de Chagas, por ELISA indireta cujo protocolo foi otimizado no laboratório de imunologia da Unidade de Ensino e Investigação Clínica de Doenças Tropicais IHMT-UNL.

Os resultados da determinação da reatividade serológica dos anticorpos do tipo IgG total e IgM presentes em amostras de 330 soros de indivíduos com doença de Chagas, em que 235 são da América Latina (111 da Argentina, 37 do Brasil, 13 de Cuba, 74 do México) e 95 de Espanha contra os antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y obtidos por ELISA indireta, estão representados na figura 6.

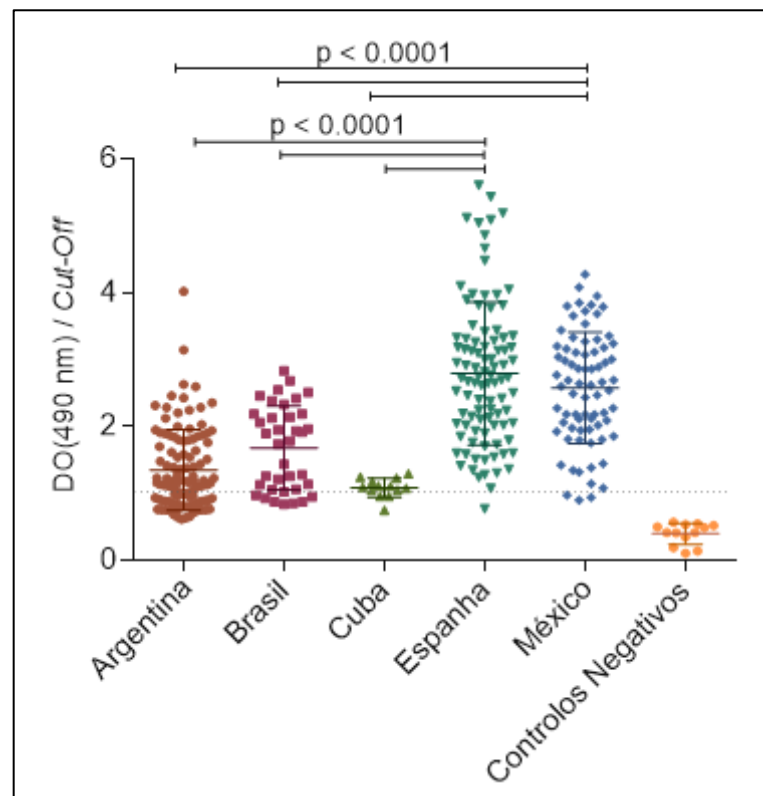


**Figura 6** - Reatividade serológica dos anticorpos do tipo IgG total e IgM presentes em amostras de 330 soros de indivíduos da América Latina imigrantes na Europa (111 da Argentina, 37 do Brasil, 13 de Cuba, 74 do México) e 95 de Espanha com doença de Chagas, contra antígenos de *Trypanosoma cruzi* tripomastigota da estirpe Y, com o espectrofotómetro ajustado para o comprimento de onda 415 e 490 nm respetivamente. O eixo das ordenadas corresponde ao quociente entre densidade ótica de um soro de um indivíduo com doença de Chagas e a média de três controlos negativos utilizados em cada ensaio ELISA. O eixo das abcissas corresponde às amostras de soros. A linha a tracejado representa o valor a partir do qual um soro foi considerado com reatividade serológica positiva ( $DO/Cut-Off \geq 1$ ).

A análise dos dados representados na figura 6 revela que das amostras de 330 soros de indivíduos com doença de Chagas da América Latina imigrantes na Europa (111 da Argentina, 37 do Brasil, 13 de Cuba e 74 do México) e 95 de Espanha analisados por ELISA indireta, 278 (84%) tiveram reatividade serológica positiva ( $DO/Cut-Off \geq 1$ ) para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* e 116 (35%) para anticorpos do tipo IgM anti-*T. cruzi*.

Observou-se nas amostras de soros em estudo uma reatividade serológica superior para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* do que para anticorpos do tipo IgM anti-*T. cruzi*, havendo soros com um  $DO(490nm)/Cut-Off > 4,0$  para anticorpos do tipo IgG anti-*T. cruzi* enquanto na determinação dos anticorpos do tipo IgM, os soros com maior reatividade serológica tiveram um  $DO(415nm)/Cut-Off \leq 2,5$ . Como está representado na figura 6.

Os resultados da determinação da reatividade serológica dos anticorpos do tipo IgG total presentes em amostras de 330 soros de indivíduos com doença de Chagas, discriminados por países (111 da Argentina, 37 do Brasil, 13 de Cuba, 95 de Espanha e 74 do México) contra os antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y obtidos por ELISA indireta, estão representados na figura 7.



**Figura 7** - Reatividade serológica dos anticorpos do tipo IgG total presentes em amostras de 330 soros de indivíduos da América Latina imigrantes na Europa (111 da Argentina, 37 do Brasil, 13 de Cuba, 74 do México) e 95 de Espanha com doença de Chagas, contra antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y, com o espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda 490 nm. O eixo das ordenadas corresponde ao quociente entre densidade ótica de um soro de um indivíduo com doença de Chagas e a média de três controles negativos utilizados em cada ensaio



ELISA. O eixo das abcissas corresponde às amostras de soros. A linha a tracejado representa o valor a partir do qual um soro foi considerado com reatividade serológica positiva ( $DO/Cut-Off \geq 1$ ).

A análise dos dados representados na figura 7 revela que das 330 amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas analisados por ELISA indireta, 278 (84%) tiveram reatividade serológica positiva ( $DO/Cut-Off \geq 1$ ) para IgG total anti-*T. cruzi* das quais pertencem (73/111) (66%) à Argentina, (30/37) (81%) ao Brasil (10/13) (77%) a Cuba, (94/95) (99%) a Espanha e (71/74) (96%) ao México.

Espanha foi o país com maior número de amostras de soros com reatividade serológica positiva para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi*, 94 das suas 95 amostras de soros (99%) têm reatividade serológica positiva, seguida do México, Brasil, Cuba e Argentina, respetivamente.

No número total de soros com reatividade serológica positiva para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* obtidos por ELISA, Espanha foi o país com maior número de amostras de soros com reatividade serológica positiva para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* (94/278) (34%) seguida da Argentina (73/278) (26%), México (71/278) (25%), Brasil (30/278) (11%) e Cuba (10/278) (4%) respetivamente.

As amostras de soros dos indivíduos com doença de Chagas de Espanha tiveram valores de reatividade serológica para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* superiores à dos outros países. Onze amostras de soros de Espanha tiveram um  $DO(490nm)/Cut-Off$  superior a 4,0, seguido do México com 2 amostras de soros e Argentina com 1 amostra.

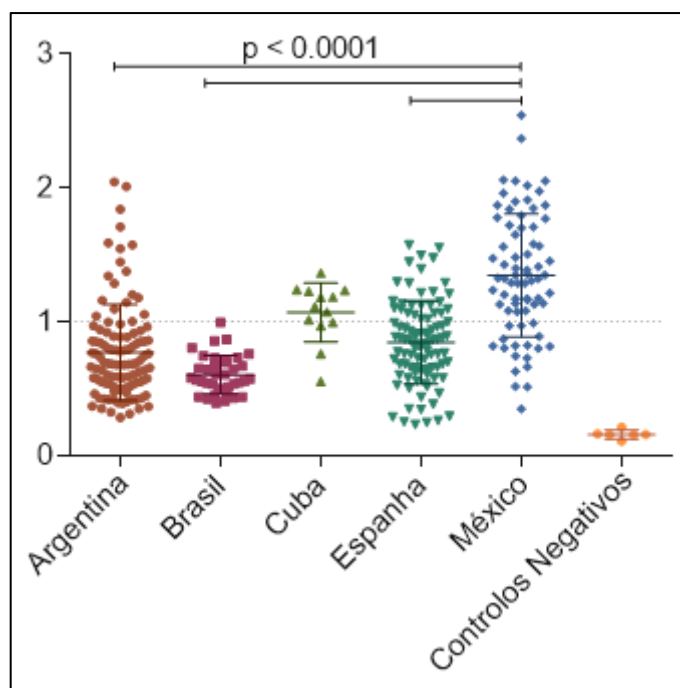
A distribuição de países da população em estudo, de acordo com o número de soros com reatividade serológica positiva e negativa, para anticorpos do tipo IgG total contra os antígenos de *T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y presentes nas amostras dos seus soros é possível observar no quadro 2.

	<b>Reatividade serológica positiva</b> n=278 (84%)	<b>Reatividade serológica negativa</b> n=52 (16%)	<b>Total</b> n=330 (100%)
<b>Argentina</b>	73 (66%)	38 (34%)	111

<b>Brasil</b>	30 (81%)	7 (19%)	37
<b>Cuba</b>	10 (77%)	3 (23%)	13
<b>Espanha</b>	94 (99%)	1 (1%)	95
<b>México</b>	71 (96%)	3 (4%)	74

**Quadro 2** - Distribuição de países da população em estudo de acordo com o seu número de soros com reatividade serológica positiva e negativa para anticorpos do tipo IgG total contra os antígenos de *T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y presentes nas amostras dos seus soros quando analisados por ELISA indireta. Foram considerados positivos os soros cujo DO(490nm)/Cut-Off foi igual ou superior a 1 unidade. O Cut-Off foi considerado a média de três soros de indivíduos sem história clínica para doença de Chagas utilizados num determinado ensaio ELISA.

Os resultados da determinação da reatividade serológica dos anticorpos do tipo IgM presentes em amostras de 229 soros de indivíduos com doença de Chagas, descritos por países (110 da Argentina, 37 do Brasil, 13 de Cuba, 95 de Espanha e 74 do México) contra os antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y obtidos por ELISA indireta, estão representados na figura 8.



**Figura 8** - Reatividade serológica dos anticorpos IgM presentes nas amostras de soros de indivíduos da América Latina imigrantes na Europa contra antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y, com o espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda 415 nm. O eixo das ordenadas corresponde ao quociente entre densidade ótica de um soro de um indivíduo com doença de Chagas e a média de três controles negativos utilizados em cada ensaio ELISA. O eixo das abscissas corresponde aos soros. A linha a tracejado representa o valor a partir do qual um soro foi considerado com reatividade serológica positiva ( $DO/Cut-Off \geq 1$ ). A linha contínua representa a média.

A análise dos dados representados na figura 8 revela que das 229 amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas analisados por ELISA indireta, 116 (51%) tiveram reatividade serológica positiva ( $DO/Cut-Off \geq 1$ ) para IgM anti-*T. cruzi* das quais pertencem (19/110) (17%) à Argentina, (1/37) (3%) ao Brasil, (10/13) (77%) a Cuba, (29/95) (31%) a Espanha e (57/74) (77%) ao México.

A reatividade serológica das amostras de soros do México para anticorpos IgM anti-*T. cruzi*, tem diferenças significativas das amostras da Argentina, Brasil e Espanha ( $p < 0,0001$ ). México e Cuba têm amostras de soros com reatividades serológicas semelhantes ( $p > 0,9999$ ).

México e Cuba foram os países com maior número de amostras de soros com reatividade serológica positiva para anticorpos do tipo IgM. 57 das suas 74 amostras de soros e 10 das suas 13 amostras de soros, respetivamente têm reatividade serológica positiva.

México foi o país com maior número de amostras de soros com reatividade serológica positiva para anticorpos do tipo IgM anti-*T. cruzi* (57/116) (49%) seguido da Espanha (29/116) (25%), Argentina (19/116) (16%), Cuba (10/116) (9%) e Brasil (1/116) (1%) respetivamente.

As amostras de soros dos indivíduos com doença de Chagas do México tiveram valores de reatividade serológica para anticorpos do tipo IgM superiores à dos outros países, com 6 amostras de soros com um  $DO(415nm)/Cut-Off$  superior a 2,5, seguido da Argentina, Espanha, Cuba e Brasil.

A distribuição de países da população em estudo de acordo com o número de soros com reatividade serológica positiva e negativa para anticorpos do tipo IgM contra os

antigénios de *T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y presentes nas amostras dos seus soros é possível observar no quadro 3.

	<b>Reatividade serológica positiva</b> n=116 (35%)	<b>Reatividade serológica negativa</b> n=213 (65%)	<b>Total</b> n=329
<b>Argentina</b>	19 (17%)	91 (83%)	110
<b>Brasil</b>	1 (3%)	36 (97%)	37
<b>Cuba</b>	10 (77%)	3 (23%)	13
<b>Espanha</b>	29 (31%)	66 (69%)	95
<b>México</b>	57 (77%)	17 (23%)	74

**Quadro 3** - Distribuição dos países em estudo de acordo com o seu número se soros com reatividade serológica positiva e negativa para anticorpos do tipo IgM contra os antigénios de *T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y. Foram considerados com reatividade serológica positiva os soros cujo DO(415nm)/Cut-Off foi igual ou superior a 1 unidade. O Cut-Off foi considerado a média de três soros de indivíduos sem história clínica de doença de Chagas utilizados num determinado ensaio ELISA.

O número de amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas, com reatividade serológica positiva para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* (278/330) (84%) superior à dos do tipo IgM anti-*T. cruzi* (116/329) (35%) e os valores de reatividade serológica dos anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* (DO(490)/Cut-Off>4) superiores aos dos anticorpos do tipo IgM anti-*T. cruzi* (DO(415)/Cut-Off< 2,5) eram esperados tendo em conta que os anticorpos do tipo IgM são produzidos 15 dias após o início da infeção por *T. cruzi*, na fase aguda da doença e os anticorpos do tipo IgG, 4 a 8 semanas depois, na fase crónica. A fase aguda raramente é observada uma vez que apenas 5% dos indivíduos são sintomáticos e a maioria dos sintomas são inespecíficos (Andrade et al, 2014). A falta de experiência e conhecimento dos profissionais de saúde de países não endémicos e possíveis barreiras ao acesso a cuidados de saúde levam a um diagnóstico numa fase tardia ou à ausência de diagnóstico (Gascon et al, 2009).

No que respeita às amostras de soros de Espanha, maior reatividade serológica para IgG anti-*T. cruzi* pode significar uma resposta imune mais eficaz ou que estes indivíduos já foram infetados anteriormente e têm células B memória. Num segundo contacto com o

parasita, a resposta imune é mais rápida porque já existem células B memória em circulação e a produção de anticorpos é maior. Espanha não é um país endémico para a doença de Chagas, mas sabe-se que tem uma grande comunidade de latino Americanos. A maioria da população imigrante em Espanha provem do Equador, Colômbia, Argentina e Bolívia. Estima-se que pelo menos 48 mil imigrantes estão infetados com *T. cruzi*, em que a maior prevalência é nos imigrantes da Bolívia (Gascon et al, 2010).

O facto de ser um país não endémico pode não ser um fator diferenciador porque todas as amostras de soros são de imigrantes de países da América Latina na Europa e todos podem ter tido contactado com o parasita e adquirido imunidade protetora. Esta pode ser perdida se o indivíduo permanecer algum tempo fora de zona endémica. O período de persistência dos anticorpos no sangue quando o sistema imune do indivíduo deixa de ser estimulado pelo contacto com o parasita é desconhecido. Seria importante saber quanto tempo os doentes da população em estudo viveram em zona endémica, há quanto tempo emigraram, se houve alguma viagem a zona endémica e qual a duração.

A linhagem genética do parasita que predomina no México é a mesma que predomina nos dois países com mais imigrantes em Espanha (TC-I) mas também é a mesma que predomina no Brasil e em Cuba então os indivíduos destes países podem ter tido contacto com a mesma estirpe do *T. cruzi*. As diferenças na reatividade serológica também podem dever-se à estirpe utilizada como antígeno neste estudo. A estirpe utilizada como antígeno no teste ELISA pertence à linhagem genética TC-II. A TC-II é rara na América do Norte (prevalência de 2,8%) e ausente na América central. Então talvez a estirpe utilizada não seja a mais sensível para a deteção de anticorpos nestas populações. Por outro lado, a TC-II é a estirpe mais isolada em doentes na fase crónica de Chagas e estudos recentes sugerem que esta é selecionada in vivo durante a infeção (Pena et al, 2011).

Os valores de reatividade serológica dos anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* são diferentes em cada amostra de soro de indivíduos com doença de Chagas, uma diferença que parece ter uma tendência dependendo do país de origem do doente. Isto pode dever-se a variações na resposta imune humoral de cada indivíduo e à capacidade imunogénica da estirpe do parasita que circula em cada país (Ayo et al, 2015).

No que respeita a estudos serológicos no contexto da doença de Chagas, já foram descritos títulos elevados de anticorpos do tipo IgM anti-*T. cruzi* em soros de indivíduos com doença de Chagas crónica. Magnani (1973) demonstrou que indivíduos com doença de Chagas crónica têm títulos de IgM, que supõe deverem-se à variabilidade genética de *T. cruzi*. Vinte anos depois Morgan (1993) observou que doentes com miocardiopatia chagásica crónica têm títulos mais elevados de anticorpos do tipo IgM do que pacientes com doença de Chagas indeterminada e segundo este a IgM é inicialmente produzida contra os antígenos de *T. cruzi*, mas a sua permanência nos tecidos e soros está diretamente associada a reatividade cruzada entre *T. cruzi* e os antígenos do hospedeiro. Em 2011, Vasconcelos e colaboradores dizem que não é possível associar a presença de títulos elevados de anticorpos do tipo IgM em indivíduos com doença de Chagas crónica a uma determinada forma clínica da doença. Outros estudos utilizaram diferentes formas de vida do parasita e diferentes antígenos sintéticos obtiveram resultados muito discrepantes no que respeita à percentagem de IgM anti-*T. cruzi* presentes em soros de indivíduos na fase crónica da doença (Betônico et al, 1999; Umezawa et al, 1999; Vasconcelos et al, 2011; Zuñiga et al, 1999).

Neste estudo não é possível avaliar a relação entre os títulos de anticorpos do tipo IgM e a forma clínica da doença de Chagas em que os pacientes se encontram, uma vez que a história clínica da população em estudo não é conhecida. Contudo verifica-se a existência de títulos elevados de IgM em doentes que se supõe serem chagásicos crónicos e numa percentagem superior à descrita na literatura. É possível que se deva à utilização de antígenos de *T. cruzi* diferentes, uma vez que neste estudo foi utilizado extrato total de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y e nos estudos referidos, não.

A reatividade serológica para IgM anti-*T. cruzi* das amostras de soros de Cuba e México, pode ser explicada pela sua proximidade geográfica e predominância da mesma linhagem genética do parasita (TC-I) (Brenière et al, 2016). É possível que as suas amostras de soros tenham anticorpos para parasitas desta linhagem genética e que os títulos de IgM estejam relacionados com a variabilidade genética do parasita.

No teste ELISA indireto para o diagnóstico da doença de Chagas, o antígeno de *T. cruzi* encontra-se aderido à placa de ELISA e os soros a serem testados são-lhe adicionados. Se existirem nos soros anticorpos anti-*T. cruzi* haverá formação de um complexo antígeno-anticorpo que é detetado pela adição de um anticorpo secundário ao qual é ligado uma enzima. Quando se adiciona um substrato específico para a enzima, há uma reação colorimétrica que pode ser medida.

Sensibilidade é a capacidade de um teste detetar a doença de entre os portadores da mesma e especificidade é a capacidade de o teste excluir os indivíduos que não têm a doença. A sensibilidade e especificidade do teste ELISA no diagnóstico da doença de Chagas pode ser afetada por fatores como a estirpe e o estágio de vida do parasita, a preparação do extrato e os controlos positivos e negativos utilizados (Guzmán-Gómez et al, 2015).

Para assegurar uma sensibilidade e especificidade adequadas é recomendado que sejam utilizados antígenos de estirpes locais (Araújo et al, 2013). A estirpe de *T. cruzi* utilizada neste estudo (Y) pertence à linhagem genética TcII que está associada a ciclos de transmissão domésticos e está presente na América do Sul com uma prevalência de 10,4% (Araújo et al, 2013; Brenière et al, 2016). Contudo não se pode dizer com certeza a estirpe que infetou os indivíduos da população em estudo.

Os testes ELISA baseados em antígenos tripomastigotas demonstraram maior especificidade e em alguns casos, maior sensibilidade (Araújo et al, 2013). O estágio de vida tripomastigota de *T. cruzi* é importante por ser a forma de vida infecciosa e existir apenas no hospedeiro mamífero. No entanto a maioria dos testes serológicos, incluídos nos testes ELISA comerciais, utilizam antígenos de epimastigota, a forma de vida replicativa, mas não infecciosa que reside no inseto por ser uma forma do parasita segura e mais fácil e económica de obter (Alves et al, 2016; Santos et al, 2016).

Neste estudo, para a determinação dos níveis de anticorpos do tipo IgG total e IgM contra os antígenos de *T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y em amostras de soros de indivíduos com história clínica de doença de Chagas, foi realizado um teste ELISA indireto, cujo protocolo foi otimizado no laboratório de imunologia da Unidade de Ensino e Investigação Clínica de Doenças Tropicais IHMT-UNL.

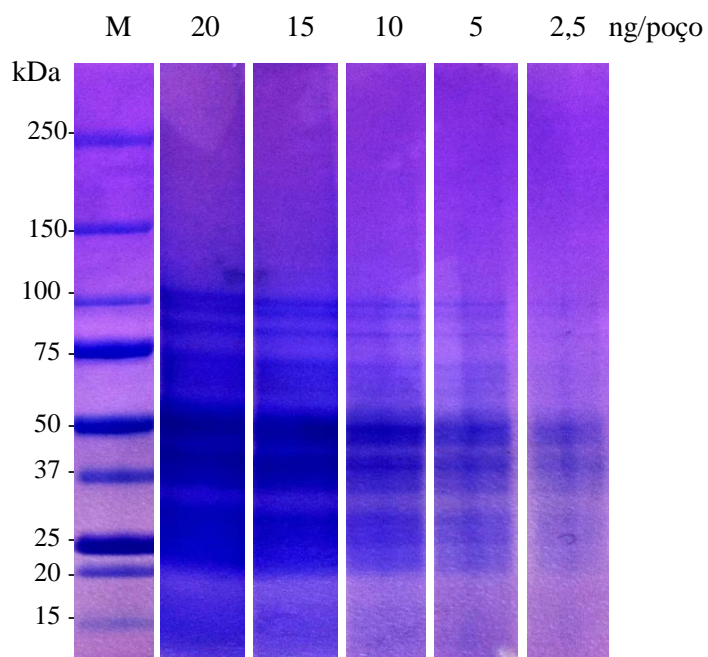
Os testes ELISA baseados em extratos totais do parasita podem ter uma maior sensibilidade uma vez que o extrato contém inúmeros antígenos e epitopos, contudo alguns destes antígenos estão presentes em menor concentração, o que limita a reação antígeno anticorpo e outros destes determinantes antigênicos são compartilhados por microrganismos como os do gênero *Leishmania* e da espécie *Trypanosoma rangeli* o que aumenta a probabilidade de reações cruzadas e diminui a especificidade do teste (Bottino et al, 2013; Gilber et al, 2013).

Para aumentar a sensibilidade do teste ELISA desenvolvido no nosso laboratório foram testadas diferentes quantidades do extrato proteico de *T. cruzi* e feitas diluições seriadas dos soros de indivíduos com doença de Chagas: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400. Verificou-se que 1:200 era a menor quantidade de soro que permitia uma boa detecção (Pineda, 2015). Para procurar esclarecer a ocorrência de reações cruzadas neste estudo, poderiam ser realizados novos ensaios ELISA utilizando os soros da mesma população e extratos de antígenos dos referidos microrganismos.

Após a determinação dos níveis de anticorpos do tipo IgG total e IgM anti-*T. cruzi* da forma tripomastigota da estirpe Y presentes nos soros de indivíduos com doença de Chagas por ELISA indireta, foram detectados os antígenos do parasita que induziram maior título de anticorpos do tipo IgG total por Immunoblotting. Para tal foram utilizados soros com maior reatividade serológica para IgG total anti-*T. cruzi* obtidos pela ELISA.

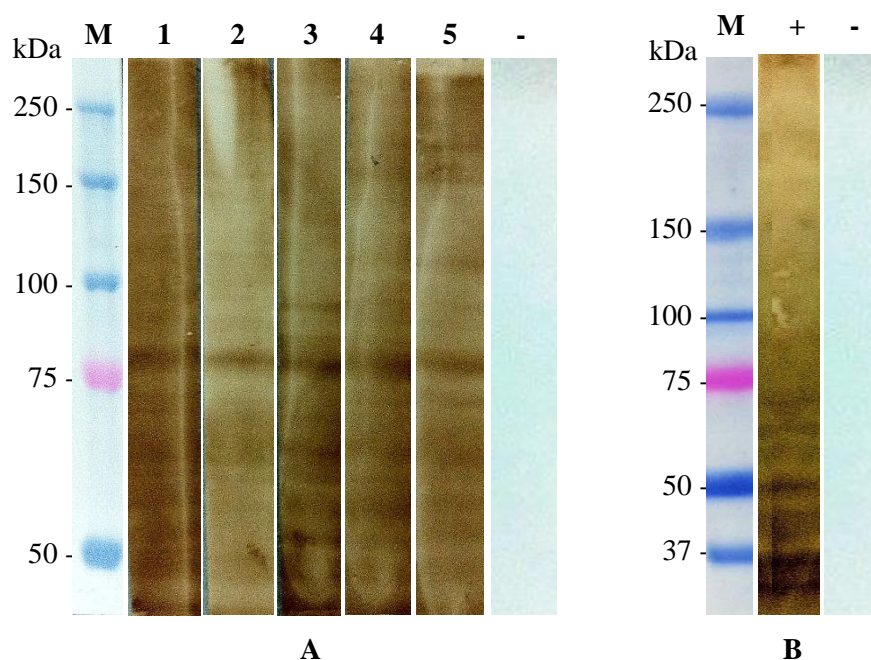
Para determinar o volume de extrato ótimo para a realização do processo foi realizado um SDS-PAGE com gel de poliacrilamina 10% onde foram testados 20 ng, 15 ng, 10 ng, 5 ng e 2,5 ng por poço. Os resultados estão representados na figura 9.





**Figura 9** - Perfil eletroforético do extrato total de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y em gel de poliacrilamida 10% corado com azul brilhante de Coomassie. M: marcador de massa molecular Precision plus protein™ dual color standards - Bio-Rad [10-250 kDa]. Em cada poço foram usadas diferentes diluições do extrato de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y: 20 µl, 15 µl, 10 µl, 5 µl, 2,5 µl.

Após a análise do perfil eletroforético do extrato total de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y em gel de poliacrilamida 10% considerou-se que 20 ng de extrato por poço era a quantidade que permitia uma boa detecção das proteínas do parasita. Realizou uma imunodeteção das proteínas de *T. cruzi* por Immunoblotting representada na figura 10.



**Figura 10 - A:** Perfil do Immunoblotting utilizando extrato total de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y. **M:** marcador de massa molecular Precision plus protein™ dual color standards - Bio-Rad. **1, 2, 3, 4, 5:** Amostras de soros com reatividade serológica DO(490)/Cut-Off > 4,0 para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi*. **-:** pool de amostras de 3 soros de indivíduos sem história clínica de doença de Chagas. Todas as amostras diluídas 1:500. **B:** Perfil do Immunoblotting utilizando extrato total de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y. **M:** marcador de massa molecular Precision plus protein™ dual color standards - Bio-Rad. **+**: pool de amostras de soros com maior reatividade serológica para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* analisados por ELISA. **-:** pool de amostras de 3 soros de indivíduos sem história clínica de doença de Chagas. Ambas as amostras diluídas 1:1000.

Como é possível observar na figura 10, tal como esperado os anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* presentes nas amostras de soros reagiram com as proteínas do extrato de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y enquanto as amostras de soros de indivíduos sem história clínica para doença de Chagas não reagiram.

Na figura 10A as cinco amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas com reatividade serológica de DO(490)/Cut-Off > 4,0 para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* reagiram com as proteínas do extrato de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y. Em todas as amostras foi possível distinguir uma banda na zona dos 50 kDa. Nos soros 1, 3, 4, 5 foi possível distinguir três bandas entre os 50 e 75 kDa. No soro 5 existe uma banda na zona um pouco a baixo de 75 kDa. Existe uma banda na zona dos 75 kDa muito evidente, comum a todos os soros. Uma banda no soro 3 na zona dos 100 kDa. Nos soros

4 e 5 é possível distinguir uma banda na zona dos 150 kDa e uma entre os 150 e os 250 kDa.

Na figura 10B no pool de amostras de soros com maior reatividade serológica para anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* analisados por ELISA foi possível distinguir 6 bandas onde os anticorpos do tipo IgG total reagiram com as proteínas de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y. Duas bandas situam-se na zona entre os 25 e os 37 kDa, uma entre os 37 e os 50 kDa, uma na zona dos 50 kDa, duas entre os 50 e os 75 kDa e uma na zona dos 100 kDa.

O Immunoblotting é um método qualitativo que pode ser vantajoso relativamente a outras técnicas serológicas na medida em que pode ser utilizado para identificar anticorpos que reconhecem diferentes frações peptídicas numa mistura antigénica complexa de antígenos de parasitas. Este é um método utilizado sobretudo em laboratórios de referência e de investigação, tem a desvantagem de ser difícil de comparar entre laboratórios devido à variabilidade da estirpe do parasita, preparação antigénica utilizada e variantes no protocolo a estas associadas (Riera et al, 2012).

Em Pineda (2015) foram detetados por Immunoblotting antígenos de *T. cruzi* epimastigota da estirpe Y que induziram maior reatividade serológica a anticorpos do tipo IgG total presentes em amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas determinadas por ELISA. Para tal foram utilizadas quinze amostras de soros, dos quais cinco correspondem aos soros utilizados no Immunoblotting realizado neste estudo. Foram distinguidos quatro grupos de proteínas imunogénicas de acordo com o seu peso molecular: grupo 1: 20-25; grupo 2: 30-40 kDa; grupo 3: 50-80 kDa e grupo 4: 100-125 kDa. Embora os resultados estejam organizados de forma diferente, uma observação cuidadosa revela que o perfil antigénico é semelhante ao obtido no presente estudo (25-37, 37-50, 50, 50-75, 75, 100, 150 kDa) o que indica que tal como está descrito na literatura as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* têm proteínas comuns ainda que tenham perfis antigénicos distintos.

Em Frazão (2016) na imunodeteção de proteínas de quatro espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum* e *L. shawi*) por Immunoblotting, soros de

indivíduos com doença de Chagas reconheceram proteínas de *Leishmania spp* com a massa molecular aproximada de 25, 35 e 77 kDa.

Sabendo que o nível de exposição ao flebotomíneo, o vetor da *Leishmania*, é superior ao nível de exposição ao triatomíneo, o vetor da doença de Chagas e tendo em conta o perfil antigénico obtido neste estudo (25-37, 37-50, 50, 50-75, 75, 100, 150 kDa) é possível que os soros de indivíduos da América Latina com doença de Chagas deste estudo tenham anticorpos para *Leishmania* e que esses tenham reconhecido determinantes antigénicos comuns ao género *Leishmania* e à espécie *T. cruzi*.

O nosso grupo de laboratório está neste momento a investigar a possibilidade de reações cruzadas em soros de indivíduos infetados com diferentes tipos de tripanosomatídeos (*T. cruzi*, *Trypanosoma brucei brucei*, *Leishmania spp*), incluindo os soros de indivíduos com doença de Chagas utilizados neste estudo.

No quadro 4 é possível comparar o peso molecular das proteínas mais imunogénicas obtidas por Immunoblotting neste estudo, utilizando antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y, o perfil obtido por Pineda (2015) utilizando antígenos de *T. cruzi* epimastigota da estirpe Y e o perfil obtido por Frazão (2016) utilizando extrato proteico de quatro espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum* e *L. shawi*).

Peso molecular das proteínas (KDa)	Perfil de immunoblotting com <i>T. cruzi</i> tripomastigota						Perfil de immunoblotting com <i>T. cruzi</i> epimastigota (Pineda, 2015)	Perfil de immunoblotting com <i>Leishmania</i> ssp (Frazão, 2016)
	1	2	3	4	5	Pool		
25-37						X	X	X
37-50						X	X	
50	X	X	X	X	X	X	X	
50-75	X		X	X	X	X		
75	X	X	X	X	X		X	X
100			X			X	X	
125							X	
150				X	X	X	X	--
150-250				X	X		--	--

**Quadro 4** - Massa molecular das proteínas de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y que reagiram com anticorpos do tipo IgG total presentes no pool de soros de indivíduos com doença de Chagas com reatividade serológica  $DO(490)/Cut-Off > 4,0$  (Figura 10B) e nas amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas testadas individualmente (Figura 10A) obtidos por Immunoblotting. Peso molecular das proteínas de *T. cruzi* epimastigota da estirpe Y que reagiram com anticorpos do tipo IgG total presentes nos 15 soros mais reativos para IgG total obtidos por ELISA, obtidos por Immunoblotting por Pineda (2015). Perfil obtido por Frazão (2016) utilizando extrato proteico de quatro espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum* e *L. shawi*) e soros de indivíduos com doença de Chagas. x: Bandas observadas no perfil de Immunoblotting.

Até ao momento não é conhecida a exata constituição proteica de *T. cruzi*, mas sabe-se que as mucinas são as glicoproteínas mais abundantes na superfície do parasita. Estas têm resíduos de açúcar e atuam como ligandos (Cardoso, 2016). A mucina de 35-50 kDa também conhecida como gp35/50 é expressa à superfície de epimastigotas e tripomastigotas (Cánepa et al, 2012), a de 45 kDa é usada pelos tripomastigotas para

aderirem aos mioblastos cardíacos (Villalta et al, 2009) e a mucina 60-200 kDa só é expressa à superfície de tripomastigotas (Cánepa et al, 2012). Todas estão envolvidas no processo de adesão e invasão das células do hospedeiro (Villalta et al, 2009; Cardoso, 2016). A superfamília das trans-sialidases está presente na superfície do parasita, ainda que em muito menos quantidade do que as mucinas e é composta por proteínas com atividade enzimática (Villalta et al, 2009). Estas têm um papel importante no reconhecimento celular, invasão e sobrevivência do parasita e o seu peso molecular varia de 60-80 até 220 kDa (Colli, 1993; Barrias et al, 2013 De Souza, 2014). De um outro grupo de proteínas semelhantes a trans-sialidases mas sem atividade enzimática é possível destacar a gp82 (82 kDa) que é expressa apenas na superfície de tripomastigotas e intervém no processo de sinalização e mobilização de cálcio intracelular (Barrias et al, 2013; Correa et al, 2013; De Souza, 2014), a Tc-85 (85 kDa) específica da forma tripomastigota, a gp85 (85kDa) que está envolvida no processo de interação parasita-hospedeiro (Barrias et al, 2013) e o ligando gp83 (83 kDa) que interage com a matriz extracelular do hospedeiro de forma a potenciar a infeção (Barrias et al, 2013; De Souza, 2014). A proteína ribossómia P2 $\beta$  (38 kDa) é reconhecida pela maioria dos soros de indivíduos infetados com *T. cruzi*, o título de anticorpos contra a P2 $\beta$  parece estar relacionado com a forma clínica da doença crónica (Fabbro et al, 2011). Tendo em conta o seu peso molecular é possível que algumas destas glicoproteínas de superfície do parasita, já descritas na literatura, tenham sido reconhecidas pelos anticorpos do tipo IgG total anti-*T. cruzi* presentes nas amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas em estudo.

No quadro 5 é possível visualizar algumas das proteínas de *T. cruzi* tripomastigota e os seus pesos moleculares já descritos em outros estudos.

<b>Proteínas de <i>T. cruzi</i> tripomastigota</b>	<b>Estágio de desenvolvimento da síntese proteica</b>	<b>Referência bibliográfica</b>
Proteína flagelar Tc-24, 24 kDa	Amastigota, epimastigota e tripomastigota	Krautz et al, 2000
Mucina gp35/50 35-50 kDa	epimastigota e tripomastigota	Barrias et al, 2013
P2β 38 kDa	---	Fabbro et al, 2011
Mucina gp45, 45 kDa	tripomastigota	Villalta et al, 2009
Ligando gp63	tripomastigota	Alves et al, 2016; de Souza, 2014
Transialidase gp80, 80 kDa	---	Barrias et al, 2013
Transialidase gp82, 82 kDa	tripomastigota	Barrias et al, 2013; Correa et al, 2013; de Souza, 2014
gp83 kDa	tripomastigota	Villalta et al, 2009; Barrias et al, 2013
Tc-85, 85 kDa	tripomastigota	Barrias et al, 2013
Transialidase gp85, 85 kDa	tripomastigota	Alves et al, 2016; de Souza, 2014
T-DAF, 87-93 kDa	tripomastigota	Krautz et al, 2000
gp 160 kDa	tripomastigota	Krautz et al, 2000

**Quadro 5** - Proteínas de *T. cruzi* tripomastigota descritas na literatura de acordo com a sua massa molecular. No perfil do Immunoblotting realizado foi possível distinguir vários conjuntos de proteínas que reagiram com os anticorpos do tipo IgG total presentes nos soros de indivíduos com doença de Chagas. Estas tinham o tamanho aproximado de 25-37, 37-50, 50, 50-75, 75, 100, 150 e 150-250 kDa.

## **6. Conclusões**



## 6. Conclusões

Este estudo teve como principal objetivo caracterizar a reatividade serológica de antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y em soros de indivíduos com doença de Chagas e para tal foram determinados os níveis de anticorpos do tipo IgG total e IgM contra os antígenos do parasita, presentes nas amostras de soros de doentes com doença de Chagas e identificados os antígenos de *T. cruzi* responsáveis pela indução da resposta imune humoral nos doentes com doença de Chagas aguda e crónica.

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir:

1. Os antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y, induziram resposta imune humoral IgG total na maioria dos indivíduos com doença de Chagas, o que confirma que a população se encontra na fase crónica da doença
2. Os antígenos de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y, induziram resposta imune humoral IgM num elevado número de amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas, possivelmente devido à variabilidade genética do parasita.
3. Anticorpos IgG total anti-*T. cruzi* presentes nas amostras reconheceram antígenos do parasita com vários tamanhos.
4. O perfil de proteínas detetado por *immunoblotting* é semelhante ao descrito por Pineda (2015) utilizando antígenos de *T. cruzi* epimastigota da estirpe Y.
5. As proteínas encontradas podem contribuir para encontrar marcadores serológicos da fase imune humoral que podem ser usados no desenvolvimento de um teste de diagnóstico único, de alta sensibilidade e especificidade e uma melhor compreensão da resposta imunitária ao *T. cruzi*.

## **7. Limitações e perspectivas futuras**

## 7. Limitações e perspectivas futuras

Os títulos de anticorpo IgG total, sub-classes de anticorpo do tipo IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) e anticorpo IgM anti-*T. cruzi* têm sido associados a uma determinada população, à forma como foi infectado (dose inóculo) e a uma forma clínica da doença de Chagas (indeterminada, cardíaca, digestiva, cardiodigestiva) assim, teria sido importante conhecer a naturalidade, o número de estadias ou viagens a zona endêmica, duração da última estadia ou viagem, a fase clínica em que se encontra e a forma como foi infectado para estudar a população quanto à relação com estes fatores.

Devido a limitações temporais, circunstanciais e materiais não foi possível dar resposta a todas as perguntas, nem testar todas as ideias que foram surgindo ao longo do estudo, mas que podem ser úteis em estudos futuros:

1. Para procurar esclarecer a ocorrência de reações cruzadas no ensaio ELISA utilizando como antígeno proteínas de *T. cruzi*, poderiam ser realizados novos ensaios utilizando os soros da mesma população de indivíduos com doença de Chagas e como antígeno extratos do género *Leishmania* e da espécie *Trypanosoma rangeli*.
2. Para aumentar a especificidade dos ensaios ELISA para a determinação de anticorpos anti-*T. cruzi* nos soros da população em estudo poderiam ser utilizados antígenos puros, quimicamente definidos, específicos de *T. cruzi* em vez do extrato total do parasita.
3. Para procurar definir o perfil antígeno de *T. cruzi* e dos seus estádios de desenvolvimento poderia ser realizado uma nova imunodeteção das proteínas do parasita por *Immunoblotting* utilizando soros da mesma população de indivíduos com doença de Chagas e como antígeno extratos das formas de vida amastigota, epimastigota e tripomastigota e comparar os perfis.
4. Para identificar as proteínas de *T. cruzi* tripomastigota da estirpe Y que reagiram com os anticorpos IgG total presentes nas amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas mais reativas para IgG total anti-*T. cruzi* obtidos por ELISA

seria importante a realização de estudos de imunoproteómica. E após identificação, estas proteínas também poderiam ser purificadas e utilizadas numa ELISA recombinante.

5. Para tentar esclarecer quais os antigénios de *T. cruzi* responsáveis pela indução e manutenção da resposta imune humoral nos pacientes com doença de Chagas poderiam se incubados individualmente os soros mais reativos para IgG total anti-*T. cruzi* e os soros menos reativos e os seus perfis proteicos comparados.

Ainda há um longo caminho a percorrer no que respeita a compreensão da resposta imune humoral a *T. cruzi* em indivíduos com doença de Chagas, fica por:

1. Esclarecer o papel exato das células B na resposta imune a *T. cruzi* em indivíduos com doença de Chagas.
2. Caracterizar e definir o papel dos subtipos de anticorpo do tipo IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) envolvidos na resposta imune de pacientes com doença de Chagas.
3. Identificar moléculas que possam ser utilizadas como marcadores da fase imune humoral.
4. Caracterizar e definir o perfil proteico de *T. cruzi* nas diferentes fases do seu ciclo de vida.
5. Desenvolver um teste de diagnóstico com alta taxa de sensibilidade e especificidade cujo uso permita um diagnóstico seguro de doença de Chagas.

## **8. Bibliografia**

**8. Bibliografia**

Álvarez JM, Fonseca R, Silva HB, Marinho CRF, Bortoluci KR, Sardinha LR, et al. Chagas disease: still many unsolved issues. *Mediators of inflammation*. 2014; 2014: 1-9.

Alves MJM, Kawahara R, Viner R, Colli W, Mattos EC, Morten T-A et al. Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *T. cruzi*. *Journal of Proteomics*. 2016: 1-11.

Ayo CM, Dalalio MMO, Visentainer JEL, Reis PG, Sippert EA, Jarduli LR et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *BioMed Research International*. 2013; 2013: 1-13.

Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO et al. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8(7): 1-10.

Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; 104(1): 9-16.

Araújo AB, Berne MEA. Conventional serological performance in diagnosis of Chagas' disease in southern Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2013; 17(2): 174-178.

Arce-Fonseca M, Rios-Castro M, Carrillo-Sánchez SC, Martínez-Cruz M, Rodríguez-Morales O. Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. *Parasites & Vectors*. 2015; 8(121): 1-7.

Barrias ES, Carvalho TMU, de Souza W. *T. cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in Immunology*. 2013; 4(186): 10.

Benedetti AFV, Cimino RO, Cajal PS, Juarez MDV, Villalpando CA, Gil JF, Marcipar IS, Krolewiecki AJ, Nasser JR. Performance of different *T. cruzi* antigens in the diagnosis of Chagas disease in patients with American cutaneous leishmaniasis from a co-endemic region in Argentina. *Tropical Medicine and International Health*. 2013; 18(9): 1103-1109.

Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *T. cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011; 24(4): 665-681.

Bern C. Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine*. 2015; 373: 456-66.

Betônico GN, Miranda EO, Silvia DA, Houghton R, Reed SG, Campos-Neto A, Mineo JR. Evaluation of a synthetic tripeptide as antigen for detection of IgM and IgG *T. cruzi* antibodies in serum samples from patients with Chagas disease or viral diseases. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 93(6): 603-606.

Bottino CG, Gomes LP, Pereira JB, Coura JR, Jr DWP, De-Simone SG. Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. *Infectious diseases*. 2013; 13: 568.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.

Brasil PEAA, Castro R, Castro L. Commercial enzyme-linked immunosorbent assay versus polymerase chain reaction for the diagnosis of chronic Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2016; 111(11): 1-19.

Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *T. cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016; 10(8): 1-19.

Cánepa GE, Mesías AC, Yu H, Chen X, Buscaglia CA. Structural Features Affecting Trafficking, Processing, and Secretion of *Trypanosoma cruzi* Mucins. The Journal of Biological Chemistry. 2012; 287(31): 26365-26376.

Cardilo F, Pinho RT, Antas PRZ, Mengel J. Immunity and immune modulation in *T. cruzi* infection. FEMS Pathogens and Disease. 2015; 73(9): 1-8.

Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC. Evasion of the immune response by *T. cruzi* during acute infection. Frontiers in immunology. 2016; 6(659): 1-15.

CDC, 2015. Parasites – American Trypanosomiasis. Disponível online em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> [acedido em 28.07.2016].

Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009; 104(1): 31-40.

Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2013; 108(8): 962-967.

Coura JR, Vinas PA, Junqueira ACV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2014; 109(7): 856-862.

Correa PRC, Cordero EM, Gentil LG, Bayer-Santos E, da Silveira JF. Genetic structure and expression of surface glycoprotein GP82, the main adhesin of *T. cruzi* metacyclic tripomastigotes. The Scientific World Journal. 2013: 1-11.



Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. *Mediators of Inflammation*. 2014; 2014:11.

Dias JCP. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2009; 104(1): 41-45.

Dias JCP. Evolution of Chagas disease screening programs and control programs - historical perspective. *Global heart*. 2015; 10(3): 193-202.

de Souza W. A short review on the morphology of *T. cruzi*: from 1909 to 1999. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 1999; 94(1): 17-36.

de Souza W. Structural organization of *T. cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2009; 104(1): 89-100.

de Souza W. *Trypanosoma cruzi*-host cell interaction. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5(339): 1-2.

Duran-Rehbein GA, Vargas-Zambrano JC, Cuéllar A, Puerta CJ, Gonzalez JM. Mammalian cellular culture models of *T. cruzi* infection: a review of the published literature – Review article. *Parasite*. 2014; 21(38): 1-9.

Dutra WO, Menezes CAS, Vilani FNA, Costa GC, Silveira ABM, Reis DA et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2009; 104(1): 208-218.

Fabbro DL, Oliveira V, Bizai ML, Denner S, Diez C, Mancipar I. Humoral Immune Response against P2 $\beta$  from *T. cruzi* in Persons with Chronic Chagas Disease: Its Relationship with Treatment Against Parasites and Myocardial Damage. *The American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 2011; 84(4): 575-580.

Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A. Chagas disease in prehistory. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2011; 83(3): 1041-1044.

Frazão J. Caracterização imunoquímica de antígenos com reatividade serológica cruzada em tripanossomatídeos (*Trypanosomabrucei brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* spp). Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa, 2016: 1-58.

Gascon J, Bern C, Pinazo M-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*. 2010; 115: 22-27.

Gilber SR, Alban SM, Gobor L, Bescrovaine JO, Myiazaki ML, Thomaz-Soccol V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *T. cruzi* infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013; 46(3): 310-315.

Gomes YM, Lorena VMB, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2009; 104(1): 115-121.

Granjon E, Dichtel-Danjoy ML, Saba E, Sabino E, Oliveira LC, Zrein M. Development of a novel multiplex immunoassay multi-cruzi for the serological confirmation of chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016; 10(4): 1-15.

Guhl F. Chagas disease in Andean countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2007; 102(1): 29-37.

Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, Lagunes-Castro M, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E et al. Highly discordant serology against *T. cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. *Parasites & Vectors*. 2015; 8: 466.

Haberland A, Saraiva SGM, Wallukat G, Ziebig R, Schimke I. Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013; 51(2): 271-294.

Ibrahim F, Thio THG, Faisal T, Neuman M. The Application of biomedical engineering techniques to the diagnosis and management of tropical diseases: A Review. *Sensors*. 2015; 15: 6947-6995.

Jackson Y, Herrera MV, Gascon J. Economic crisis and increased immigrant mobility: new challenges in managing Chagas disease in Europe. *Bull World Health Organ*. 2014; 287: 771–772.

Kloetzel J, Camargo ME, Giovannini VL. Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi*. *The Journal of Protozoology*. 1975; 22(2): 259-261.

Krautz GM, Kissinger JC, Krettli AU. The Targets of the Lytic Antibody Response against *T. cruzi*. *Parasitology Today*. 2000; 16(1): 31-34.

Kropf SP, Sá MR. The discovery of *T. cruzi* and Chagas Disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*. Rio de Janeiro. 2009; 16(1): 13-34.

Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013; 13: 342-348.

Mandal S. Epidemiological Aspects of Chagas Disease - a Review. *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*. 2014; 2(2): 1-7.

Messenger LA, Miles, MA, Bern, C. Between a bug and a hard place: *T. cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2015; 13(8): 995-1029.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2009; 104(1): 17-30.

Monteiro JPMFL. Caracterização bioquímica e propriedades biológicas de diferentes metaloproteinases de tripanosomatídeos (*Leishmania* spp., *T. cruzi* e *Trypanosomabrucei brucei*). Tese de dissertação, Universidade Nova de Lisboa. 2015: 1-83.

Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira ACO, Campos JH, Martins-Filho AO, Bela SR et al. Vesicles from different *T. cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *Journal of extracellular vesicles*. 2015; 4: 1-16.

Nouvellet P, Dumonteil E, Gourbière S. The Improbable Transmission of *T. cruzi* to Human: the missing link in the dynamics and control of Chagas disease. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2013; 7(11): 1-12.

Nunes MCP, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas Disease - An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of American College of Cardiology*. 2013; 62(9): 767-776.

Pena DA, Eger I, Nogueira L, Heck N, Menin A, Báfica A and Steindel M. Selection of TcII *T. cruzi* population following macrophage infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011; 204: 478-86.

Pereira PCM and Navarro EC. Challenges and Perspectives of Chagas Disease: A Review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2013; 19(34): 1-8.

Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B and López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. *The Lancet*. 2015; 15: 1347-1356.

Pineda H. Immunoidentification of *T. cruzi* antigens using sera from chronically infected patients. Master Thesis. Universidade Nova de Lisboa, 2015: 1-53.

Primavera KSC, Umezawa ES, Peres BA, Camargo ME, Hosinho-Shimizu S. Chagas Disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo*. 1990; 32(3): 172-180.

Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, Portús M. Short report: Identification of a Immunoblotting Pattern for the Specific Diagnosis of *T. cruzi* Infection in Human Sera. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 2012; 86(3): 412-416.

Santos FLN, Celedon PAF, Zanchin NIT, Brasil TAC, Foti L, de Sousa WV et al. Performance assessment of four chimeric *T. cruzi* antigens based on Antigen-antibody detection for diagnosis of chronic Chagas disease. *Plos One*. 2016; 11(8): 1-15.

Santiago AR, Afchain D, Capron A. Specific antigens of *T. cruzi* amastigotes and trypomastigotes. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*. 1981; 61: 369-378.

Sosa-Estani S, Segura EL. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*. 2015; 110(3): 289-298.

Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors*. 2014; 7: 317.

Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis Of Chagas' Disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011; 24(3): 592–630.

Umezawa ES, Silveira JF. Serological Diagnosis of Chagas Disease with Purified and Defined *T. cruzi* Antigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999; 94(1): 285-288.

Vasconcelos RHT, Azevedo EAN, Cavalcanti MGAM, Silva ED, Ferreira AGP, Morais CNL et al. Immunoglobulin M antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *T. cruzi* in chronic chagasic patients. *Human Immunology*. 2011; 72: 402-405.

Virgilio FS, Pontes C, Dominguez MR, Ersching J, Rodrigues MM, Vasconcelos JR. CD8+ T cell-mediated immunity during *T. cruzi* infection: A path for vaccine development? *Mediators of Inflammation*. 2014; 2014: 12.

Villalta F, Scharfstein J, Ashton AW, Tyler KM, Guan F, Mukherjee S et al. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*–host cell receptor Interactions. *Parasitology Research*. 2009; 104(6): 1251-1260.

(WHO Report, 2015) Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Third WHO report on neglected tropical diseases. Geneva. WHO.

(WHO Epid, 2015) Weekly epidemiological record. Geneva. WHO. 2015; 90(6): 33-34.

Zingales B, Colli W. *T. cruzi*: Interaction with host cells. *Current topics in microbiology and immunology*. 1985; 117: 129-152.

Zuñiga E, Montes C, Barbieri G, Gruppi A. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* alkaline antigens are elicited in sera from acute but not chronic human chagasic patients. Clinical Immunology. 1999; 93(1): 81-9.

IgG total anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros da Argentina			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	0,32	0,40	0,80
2	0,24	0,40	0,61
3	0,32	0,40	0,81
4	0,30	0,40	0,76
5	0,36	0,40	0,91
6	0,29	0,40	0,74
7	0,28	0,28	0,99
8	0,28	0,28	0,98
9	0,30	0,40	0,76
10	0,24	0,28	0,85
11	0,31	0,40	0,79
12	0,23	0,25	0,90
13	0,26	0,25	1,03
14	0,23	0,25	0,89
15	0,58	0,25	2,28
16	0,60	0,25	2,35
17	0,45	0,25	1,78
18	0,67	0,25	2,63
19	0,29	0,25	1,13
20	1,02	0,85	1,19
21	1,18	0,85	1,39
22	1,73	0,85	2,03
23	0,96	0,85	1,12
24	1,63	0,85	1,91
25	1,81	0,85	2,12
26	1,54	0,85	1,80
27	1,31	0,85	1,54
28	1,46	0,78	1,86
29	1,28	0,78	1,64
30	1,26	0,78	1,61
31	0,96	0,78	1,23
32	0,26	0,40	0,65
33	0,26	0,40	0,64
34	0,91	0,78	1,16
35	0,35	0,40	0,89

36	0,96	0,78	1,23
37	1,00	0,78	1,28
38	0,86	0,78	1,10
39	0,40	0,34	1,19
40	0,54	0,34	1,58
41	0,28	0,34	0,82
42	0,30	0,34	0,88
43	0,37	0,40	0,93
44	0,39	0,34	1,16
45	0,34	0,34	1,02
46	0,29	0,34	0,87
47	0,35	0,40	0,88
48	0,38	0,34	1,12
49	0,31	0,28	1,11
50	0,48	0,42	1,12
51	0,30	0,28	1,08
52	0,30	0,40	0,76
53	0,26	0,28	0,93
54	0,22	0,28	0,77
55	0,23	0,28	0,80
56	0,52	0,28	1,85
57	0,52	0,28	1,86
58	0,49	0,28	1,76
59	1,94	1,00	1,95
60	1,79	1,00	1,80
61	1,81	1,00	1,81
62	1,44	1,00	1,44
63	1,69	1,00	1,70
64	1,89	1,00	1,89
65	2,46	1,00	2,46
66	2,28	1,00	2,28
67	2,07	0,94	2,20
68	0,45	0,40	1,13
69	1,79	0,94	1,90
70	0,46	0,40	1,16
71	0,38	0,40	0,96
72	1,45	0,94	1,54
73	0,38	0,40	0,95
74	0,47	0,40	1,19

75	1,82	0,94	1,94
76	1,73	0,94	1,84
77	1,85	0,94	1,96
78	1,88	0,94	2,00
79	2,11	0,94	2,24
80	0,55	0,44	1,26
81	1,75	0,44	4,02
82	1,06	0,44	2,43
83	1,01	0,44	2,31
84	0,64	0,44	1,48
85	0,60	0,40	1,51
86	0,27	0,40	0,68
87	0,38	0,40	0,96
88	0,56	0,40	1,40
89	1,37	0,44	3,14
90	0,53	0,44	1,22
91	0,33	0,44	0,76
92	0,33	0,40	0,84
93	0,25	0,40	0,63
94	0,30	0,40	0,75
95	0,30	0,40	0,75
96	0,46	0,40	1,15
97	0,40	0,40	1,01
98	0,33	0,40	0,82
99	0,40	0,40	1,01
100	0,42	0,40	1,05
101	0,47	0,40	1,19
102	0,30	0,40	0,74
103	0,28	0,40	0,71
104	0,33	0,40	0,83
105	0,56	0,40	1,41
106	0,44	0,40	1,10
107	0,55	0,40	1,38
108	0,47	0,40	1,18
109	1,03	0,40	2,59
110	0,54	0,40	1,36
111	0,35	0,40	0,88



IgG Total anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros do Brasil			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	1,47	0,55	2,68
2	1,05	0,51	2,06
3	1,12	0,51	2,18
4	1,22	0,51	2,38
5	1,00	0,51	1,96
6	0,73	0,51	1,43
7	1,24	0,51	2,42
8	0,35	0,40	0,87
9	0,47	0,55	0,85
10	1,37	0,55	2,51
11	0,48	0,40	1,21
12	0,45	0,40	1,13
13	0,45	0,40	1,13
14	0,50	0,40	1,26
15	1,55	0,55	2,83
16	0,39	0,40	0,97
17	0,50	0,40	1,25
18	0,58	0,55	1,06
19	1,20	0,55	2,19
20	0,38	0,40	0,95
21	1,04	0,55	1,89
22	0,97	0,55	1,78
23	0,42	0,40	1,05
24	1,05	0,54	1,95
25	0,69	0,54	1,28
26	1,05	0,54	1,93
27	0,94	0,54	1,74
28	1,26	0,54	2,33
29	1,04	0,54	1,91
30	1,15	0,54	2,13
31	0,55	0,54	1,02
32	0,26	0,28	0,92
33	0,25	0,28	0,87
34	0,72	0,28	2,54
35	0,70	0,28	2,46
36	0,61	0,28	2,14
37	0,33	0,40	0,84

IgG Total anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros de Cuba			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	0,55	0,45	1,23
2	0,58	0,45	1,29
3	0,50	0,45	1,11
4	0,49	0,45	1,10
5	0,47	0,45	1,05
6	0,55	0,45	1,24
7	0,43	0,45	0,95
8	0,52	0,45	1,17
9	0,49	0,45	1,09
10	0,48	0,45	1,07
11	0,34	0,45	0,75
12	0,43	0,45	0,96
13	0,47	0,45	1,05

IgG total anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros de Espanha			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	1,75	0,56	3,13
2	1,55	0,56	2,77
3	1,13	0,56	2,02
4	1,86	0,56	3,32
5	1,75	0,56	3,13
6	1,26	0,56	2,26
7	1,25	0,56	2,24
8	1,47	0,46	3,18
9	0,49	0,46	1,07
10	1,86	0,46	4,05
11	1,46	0,46	3,18
12	1,75	0,56	3,14
13	1,70	0,57	3,01
14	0,65	0,46	1,41
15	0,76	0,57	1,35
16	1,69	0,57	2,99
17	1,34	0,46	2,92
18	0,74	0,46	1,60
19	1,50	0,57	2,66
20	0,74	0,57	1,30
21	0,72	0,57	1,28
22	1,93	0,57	3,41
23	1,55	0,57	2,73
24	1,68	0,97	1,73
25	1,75	0,97	1,79
26	1,97	0,97	2,02
27	1,47	0,97	1,51
28	1,82	0,46	3,96
29	2,22	0,44	5,08
30	1,66	0,44	3,81
31	1,80	0,97	1,85
32	1,50	0,97	1,54
33	1,95	0,44	4,48
34	2,23	0,44	5,12
35	2,26	0,44	5,19
36	2,44	0,97	2,50
37	2,12	0,44	4,86
38	2,37	0,44	5,43
39	2,03	0,44	4,67
40	0,25	0,07	3,35
41	2,60	0,97	2,67
42	0,25	0,07	3,31

43	1,63	1,02	1,60
44	0,15	0,07	2,05
45	0,12	0,07	1,58
46	0,06	0,07	0,77
47	1,80	1,02	1,76
48	0,26	0,07	3,51
49	0,37	0,07	5,04
50	0,28	0,07	3,81
51	2,06	1,02	2,02
52	2,48	0,83	3,00
53	2,38	0,83	2,88
54	2,61	0,83	3,15
55	1,53	1,02	1,50
56	1,74	1,02	1,70
57	1,69	0,83	2,04
58	2,10	0,83	2,53
59	1,93	1,02	1,90
60	2,20	0,83	2,65
61	1,13	0,83	1,36
62	2,44	0,83	2,95
63	2,81	0,69	4,10
64	2,23	1,02	2,19
65	2,17	1,02	2,13
66	3,84	0,69	5,60
67	2,72	0,69	3,98
68	1,43	0,55	2,61
69	2,72	0,69	3,97
70	2,67	0,69	3,89
71	2,25	0,69	3,28
72	2,58	0,69	3,77
73	2,28	0,69	3,33
74	1,60	0,55	2,92
75	0,68	0,55	1,24
76	1,15	0,55	2,11
77	1,35	0,55	2,46
78	1,44	0,55	2,64
79	1,47	0,55	2,70
80	1,49	0,55	2,73
81	1,41	0,51	2,75
82	1,12	0,51	2,19
83	1,24	0,51	2,42
84	1,15	0,51	2,24
85	1,48	0,51	2,89
86	1,22	0,51	2,38
87	1,23	0,51	2,41

88	0,93	0,59	1,58
89	2,02	0,59	3,44
90	1,82	0,59	3,09
91	1,88	0,59	3,19
92	1,66	0,59	2,82
93	1,26	0,59	2,15
94	1,13	0,59	1,93
95	1,91	0,59	3,26

IgG total anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros do México			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	1,15	0,39	2,98
2	1,48	0,39	3,81
3	1,26	0,39	3,27
4	1,20	0,39	3,10
5	1,30	0,39	3,35
6	1,29	0,39	3,33
7	1,04	0,39	2,69
8	1,16	0,39	3,00
9	1,01	0,27	3,80
10	1,13	0,27	4,27
11	1,08	0,27	4,08
12	1,00	0,27	3,78
13	1,02	0,27	3,85
14	0,91	0,27	3,44
15	0,85	0,27	3,20
16	0,73	0,27	2,77
17	1,14	0,39	2,95
18	1,41	0,39	3,65
19	0,88	0,39	2,27
20	1,23	0,39	3,18
21	1,01	0,39	2,62
22	0,95	0,39	2,47
23	1,12	0,39	2,89
24	1,11	0,39	2,86
25	0,54	0,24	2,27
26	0,88	0,24	3,72
27	0,76	0,24	3,24
28	0,72	0,24	3,04
29	0,43	0,24	1,81
30	0,51	0,24	2,18
31	0,73	0,24	3,07
32	0,63	0,24	2,69
33	0,82	0,38	2,18
34	1,32	0,38	3,53
35	0,83	0,38	2,20
36	1,10	0,38	2,92
37	1,07	0,38	2,86
38	0,79	0,38	2,11
39	1,48	0,38	3,95
40	1,38	0,38	3,69

41	1,00	0,40	2,49
42	1,07	0,40	2,66
43	1,06	0,40	2,64
44	0,85	0,40	2,12
45	0,83	0,40	2,06
46	1,25	0,40	3,11
47	1,33	0,40	3,30
48	0,79	0,40	1,95
49	0,81	0,37	2,18
50	0,78	0,37	2,09
51	0,69	0,37	1,85
52	0,67	0,37	1,79
53	0,81	0,37	2,18
54	1,17	0,37	3,16
55	0,49	0,37	1,32
56	0,65	0,37	1,75
57	1,05	0,37	2,86
58	0,53	0,37	1,44
59	0,93	0,37	2,54
60	0,52	0,37	1,42
61	0,51	0,37	1,38
62	0,45	0,40	1,14
63	0,49	0,37	1,34
64	0,74	0,37	2,01
65	0,66	0,37	1,81
66	0,44	0,41	1,08
67	0,82	0,41	1,98
68	0,39	0,41	0,94
69	0,37	0,41	0,90
70	0,40	0,41	0,97
71	0,80	0,41	1,94
72	0,79	0,41	1,92
73	1,09	0,45	2,43
74	1,16	0,45	2,60

IgM anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros da Argentina			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	0,17	0,14	1,16
2	0,17	0,14	1,18
3	0,22	0,14	1,55
4	0,13	0,14	0,93
5	0,29	0,14	2,04
6	0,18	0,14	1,29
7	0,26	0,14	1,84
8	0,23	0,14	1,59
9	0,13	0,14	0,92
10	0,21	0,14	1,45
11	0,10	0,14	0,68
12	0,29	0,14	2,01
13	0,24	0,14	1,71
14	0,16	0,14	1,15
15	0,15	0,14	1,05
16	0,16	0,14	1,10
17	0,12	0,14	0,85
18	0,13	0,14	0,89
19	0,19	0,14	1,34
20	0,13	0,14	0,94
21	0,20	0,14	1,38
22	0,22	0,14	1,57
23	0,17	0,14	1,20
24	0,14	0,14	0,97
25	0,14	0,14	0,98
26	0,22	0,25	0,89
27	0,39	0,40	0,96
28	0,32	0,40	0,79
29	0,40	0,40	1,00
30	0,32	0,40	0,80
31	0,31	0,40	0,77
32	0,17	0,40	0,43
33	0,21	0,40	0,51
34	0,34	0,40	0,85
35	0,16	0,40	0,39
36	0,27	0,40	0,68
37	0,28	0,40	0,69
38	0,28	0,40	0,69
39	0,36	0,40	0,89

40	0,22	0,40	0,54
41	0,26	0,40	0,64
42	0,26	0,40	0,65
43	0,27	0,40	0,66
44	0,20	0,40	0,50
45	0,31	0,40	0,76
46	0,17	0,40	0,42
47	0,41	0,40	1,00
48	0,33	0,40	0,81
49	0,17	0,40	0,42
50	0,24	0,40	0,58
52	0,21	0,40	0,52
53	0,16	0,40	0,39
54	0,16	0,40	0,41
55	0,20	0,40	0,50
56	0,27	0,40	0,68
57	0,19	0,40	0,46
58	0,27	0,40	0,68
59	0,32	0,40	0,78
60	0,21	0,40	0,51
61	0,15	0,40	0,37
62	0,26	0,40	0,64
63	0,23	0,40	0,57
64	0,25	0,40	0,63
65	0,28	0,40	0,69
66	0,35	0,40	0,86
67	0,37	0,40	0,91
68	0,42	0,40	1,04
69	0,28	0,40	0,68
70	0,18	0,40	0,45
71	0,23	0,40	0,56
72	0,33	0,40	0,82
73	0,12	0,40	0,29
74	0,24	0,40	0,58
75	0,22	0,40	0,54
76	0,22	0,40	0,55
77	0,15	0,40	0,37
78	0,24	0,40	0,59
79	0,25	0,40	0,61
80	0,19	0,40	0,48
81	0,24	0,40	0,59
82	0,13	0,40	0,31
83	0,17	0,40	0,43

84	0,20	0,40	0,49
85	0,34	0,40	0,84
86	0,17	0,40	0,42
87	0,32	0,40	0,79
88	0,24	0,40	0,59
89	0,27	0,40	0,66
90	0,32	0,40	0,79
91	0,22	0,40	0,55
92	0,30	0,40	0,75
93	0,14	0,40	0,35
94	0,13	0,40	0,32
95	0,28	0,40	0,68
96	0,30	0,40	0,73
97	0,25	0,40	0,61
98	0,23	0,40	0,57
99	0,32	0,40	0,79
100	0,35	0,40	0,86
101	0,31	0,40	0,76
102	0,22	0,40	0,55
103	0,17	0,40	0,42
104	0,22	0,40	0,54
105	0,34	0,40	0,85
106	0,17	0,40	0,42
107	0,14	0,40	0,35
108	0,23	0,40	0,58
109	0,19	0,40	0,47
110	0,34	0,40	0,84
111	0,29	0,40	0,72

IgM anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros do Brasil			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	0,14	0,25	0,58
2	0,13	0,25	0,54
3	0,21	0,25	0,86
4	0,13	0,25	0,51
5	0,16	0,25	0,64
6	0,17	0,25	0,70
7	0,17	0,25	0,67
8	0,13	0,25	0,55
9	0,15	0,25	0,61
10	0,18	0,25	0,75
11	0,21	0,25	0,87
12	0,10	0,25	0,42
13	0,18	0,25	0,72
14	0,16	0,25	0,65
15	0,15	0,25	0,61
16	0,18	0,25	0,73
17	0,14	0,25	0,57
18	0,16	0,25	0,65
19	0,14	0,25	0,55
20	0,13	0,25	0,53
21	0,11	0,25	0,44
22	0,13	0,25	0,54
23	0,12	0,25	0,50
24	0,19	0,25	0,76
25	0,24	0,25	0,99
26	0,11	0,25	0,46
27	0,16	0,25	0,67
28	0,12	0,25	0,50
29	0,11	0,25	0,44
30	0,20	0,25	0,81
31	0,11	0,25	0,44
32	0,18	0,25	0,73
33	0,11	0,25	0,43
34	0,14	0,25	0,57
35	0,10	0,25	0,41
36	0,14	0,25	0,56
37	0,10	0,25	0,40

IgM anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros de Cuba			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	0,14	0,25	0,55
2	0,34	0,25	1,37
3	0,29	0,25	1,18
4	0,30	0,25	1,24
5	0,26	0,25	1,07
6	0,24	0,25	0,97
7	0,30	0,25	1,23
8	0,27	0,25	1,11
9	0,29	0,25	1,19
10	0,24	0,25	0,99
11	0,25	0,25	1,01
12	0,19	0,25	0,76
13	0,30	0,25	1,24

IgM anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros de Espanha			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	0,26	0,27	0,97
2	0,18	0,27	0,69
3	0,22	0,27	0,82
4	0,35	0,27	1,29
5	0,33	0,27	1,22
6	0,29	0,27	1,09
7	0,25	0,27	0,94
8	0,30	0,27	1,13
9	0,21	0,27	0,77
10	0,25	0,27	0,93
11	0,30	0,27	1,12
12	0,31	0,27	1,15
13	0,33	0,27	1,23
14	0,20	0,27	0,75
15	0,30	0,27	1,12
16	0,09	0,27	0,34
17	0,20	0,27	0,73
18	0,26	0,27	0,96
19	0,23	0,27	0,87
20	0,07	0,27	0,26
21	0,32	0,27	1,21
22	0,20	0,27	0,75
23	0,23	0,27	0,84
24	0,19	0,27	0,72
25	0,09	0,27	0,35
26	0,31	0,27	1,15
27	0,12	0,27	0,44
28	0,27	0,27	0,99
29	0,24	0,27	0,89
30	0,16	0,27	0,58
31	0,30	0,27	1,14
32	0,24	0,27	0,88
33	0,24	0,27	0,89
34	0,26	0,27	0,95
35	0,16	0,27	0,61
36	0,18	0,27	0,66
37	0,29	0,27	1,07
38	0,21	0,27	0,78
39	0,18	0,27	0,68

40	0,17	0,27	0,63
41	0,27	0,27	1,02
42	0,29	0,27	1,09
43	0,17	0,27	0,62
44	0,22	0,27	0,83
45	0,08	0,27	0,30
46	0,18	0,27	0,66
47	0,07	0,27	0,25
48	0,26	0,27	0,96
49	0,19	0,27	0,70
50	0,24	0,27	0,88
51	0,16	0,27	0,61
52	0,25	0,27	0,92
53	0,23	0,27	0,87
54	0,14	0,27	0,50
55	0,24	0,27	0,91
56	0,24	0,27	0,91
57	0,08	0,27	0,29
58	0,14	0,27	0,54
59	0,06	0,27	0,23
60	0,07	0,27	0,25
61	0,24	0,27	0,91
62	0,18	0,27	0,66
63	0,13	0,27	0,47
64	0,23	0,27	0,87
65	0,18	0,27	0,66
66	0,18	0,27	0,68
67	0,22	0,27	0,80
68	0,23	0,27	0,87
69	0,30	0,27	1,10
70	0,17	0,27	0,64
71	0,10	0,27	0,38
72	0,19	0,27	0,72
73	0,14	0,27	0,52
74	0,20	0,27	0,76
75	0,15	0,27	0,56
76	0,20	0,27	0,76
77	0,16	0,27	0,58
78	0,24	0,27	0,89
79	0,21	0,27	0,78
80	0,27	0,27	1,00
81	0,16	0,27	0,58
82	0,14	0,27	0,53

83	0,22	0,27	0,84
84	0,26	0,25	1,06
85	0,25	0,25	1,02
86	0,39	0,25	1,57
87	0,34	0,25	1,39
88	0,37	0,25	1,50
89	0,32	0,25	1,30
90	0,38	0,25	1,55
91	0,26	0,25	1,07
92	0,36	0,25	1,45
93	0,36	0,25	1,48
94	0,32	0,25	1,29
95	0,26	0,25	1,05

IgM anti- <i>T. cruzi</i> em amostras de soros do México			
Soro	DO	Cut-Off	DO/Cut-Off
1	0,13	0,25	0,52
2	0,09	0,25	0,35
3	0,18	0,25	0,73
4	0,34	0,25	1,39
5	0,30	0,25	1,21
6	0,24	0,25	0,99
7	0,29	0,25	1,17
8	0,20	0,25	0,82
9	0,28	0,25	1,14
10	0,15	0,25	0,63
11	0,16	0,25	0,66
12	0,13	0,25	0,51
13	0,20	0,25	0,82
14	0,20	0,25	0,80
15	0,24	0,25	0,97
16	0,20	0,25	0,82
17	0,18	0,14	1,29
18	0,20	0,14	1,43
19	0,15	0,14	1,07
20	0,22	0,14	1,56
21	0,11	0,14	0,80
22	0,27	0,14	1,87
23	0,29	0,14	2,05
24	0,26	0,14	1,85

25	0,27	0,14	1,90
26	0,34	0,14	2,37
27	0,24	0,14	1,70
28	0,25	0,14	1,78
29	0,21	0,14	1,50
30	0,29	0,14	2,05
31	0,28	0,14	1,96
32	0,29	0,14	2,06
33	0,28	0,14	1,97
34	0,26	0,14	1,84
35	0,21	0,14	1,45
36	0,22	0,14	1,57
37	0,21	0,14	1,48
38	0,19	0,14	1,32
39	0,19	0,14	1,36
40	0,36	0,14	2,54
41	0,27	0,14	1,87
42	0,24	0,14	1,65
43	0,18	0,14	1,29
44	0,29	0,14	2,02
45	0,24	0,14	1,71
46	0,20	0,14	1,41
47	0,19	0,14	1,31
48	0,27	0,14	1,91
49	0,25	0,14	1,72
50	0,25	0,14	1,77
51	0,16	0,14	1,13

52	0,18	0,14	1,29
53	0,15	0,14	1,08
54	0,17	0,14	1,20
55	0,11	0,14	0,74
56	0,15	0,14	1,08
57	0,17	0,14	1,17
58	0,12	0,14	0,82
59	0,14	0,14	0,97
60	0,17	0,14	1,17
61	0,16	0,14	1,13
62	0,26	0,14	1,79
63	0,19	0,14	1,35
64	0,21	0,14	1,48
65	0,20	0,14	1,40
66	0,19	0,14	1,33
67	0,16	0,14	1,14
68	0,12	0,14	0,87
69	0,18	0,14	1,24
70	0,23	0,14	1,58
71	0,17	0,14	1,17
72	0,19	0,14	1,32
73	0,19	0,14	1,35
74	0,13	0,14	0,89